

## **TEKNIIKAN JA LIIKENTEEN TOIMIALA**

### **Laboratorioalan koulutusohjelma**

### **Tutkimuspainotteinen suuntautumisvaihtoehto**

### **Opinnäytetyö**

### **BETULIINIJOHDANNAISET**

**Työn tekijä: Erkki Metsälä**  
**Työn valvoja: Pirjo Napari, FM**  
**Työn ohjaaja: Salme Koskimies, FT**  
**Sami Alakurtti, DI**  
**Jari Yli-Kauhaluoma, FT**

**Työ hyväksytty: \_\_. \_\_. 2007**

**Pirjo Napari**  
**lehtori**

## ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen (VTT) prosessikemian osaamiskeskukselle.

Haluan kiittää VTT:n ohjaajiani filosofian tohtori Salme Koskimiestä, filosofian tohtori Jari Yli-Kauhaluomaa ja diplomi-insinööri Sami Alakurtia hyvästä ja reilusta opastuksesta opinnäytetyöprosessin aikana. Lisäksi haluan kiittää hyvästä ja avoimesta työskentelyilmapiiristä koko VTT:n prosessikemian osaamiskeskuksen henkilökuntaa ja työharjoittelutovereitani.

Haluan kiittää erityisesti opinnäytetyötäni valvonutta opettajaa, filosofian maisteri Pirjo Naparia, aktiivisesta ja uutterasta valvonta- ja ohjaustyöstä koko opinnäytetyöprosessini aikana.

Erityiskiitokset kuuluvat vanhemmilleni Erkki Metsälälle ja Aila Metsälällä, jotka omilla panoksillaan tukivat opinnäytetyöni edistymistä.

Lisäksi haluan kiittää ystäviäni, koripallotovereitani ja kaikkia niitä ihmisiä, jotka pitivät mieleni virkeänä opinnäytetyöprosessin aikana.

Kiitos!

Helsingissä 7.12.2007

Erkki Metsälä

## INSINÖÖRITYÖN TIIVISTELMÄ

Tekijä: Erkki-Johannes Metsälä	
Työn nimi: Betuliinijohdannaiset	
Päivämäärä: 7.12.2007	Sivumäärä: 56 s. + 21 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioala	Suuntautumisvaihtoehto: Tutkimuspainotteinen
Työn valvoja: Pirjo Napari, FM	
Työn ohjaaja: Salme Koskimies, FT	
<p>Opinnäytetyön aiheena oli betuliinijohdannaiset. Tavoitteena oli tehdä synteesisarja, jossa betuliiniin ja betulonihappoon liitettiin esteröintireaktiolla erilaisia happoja, terpeenialkoholeja ja fenoleja. Lisäksi tavoitteena oli saada selvyys bioaktiivisista ominaisuuksista ja mahdollisista muista soveltuvuuksista. Työ tehtiin osana VTT:n Kuori-tutkimusprojektia, jossa betuliinille ja muille puiden kuori- ja uuteaineille pyritään löytämään kaupallisia käyttökohteita esimerkiksi lääkeaineina, pestisideinä ja kosmetiikka-alan raaka-aineina.</p> <p>Betuliini on pentasyklinen triterpeenialkoholi, jota saadaan eristettyä varsin tehokkaasti koivun kuoresta ja tuohesta uuttamalla. Betuliinilla ja sen johdannaisilla on todistettu olevan useita lääkinnällisiä vaikutuksia kuten esimerkiksi tulehduksia estäviä, antiviraalisia, antimalaarisia, antitumoraalisia sekä anti-HIV-aktiivisuutta.</p> <p>Betuliinissa, lup-20(29)-ene-3<math>\beta</math>,28-diolissa, on käytännössä kolme reaktiivista ryhmää, primäärinen hydroksyyli-ryhmä hiilessä 28, sekundäärinen hydroksyyli-ryhmä hiilessä 3 sekä alkeenirakenne hiilessä 20, joista jokaisen ryhmän reaktioilla voidaan helposti saada aikaan betuliinijohdannaisia.</p> <p>Betuliinin ja betulonihapon reaktioihin valittiin erilaisia esteröintimenetelmiä, joissa katalyytteinä käytettiin mm. <i>p</i>-tolueenisulfonihappoa, titaani(IV)isopropylaattia, N,N-dimetyyli-4-aminopyridiini ja <i>N</i>-(3-dimetyyliaminopropyyli)-<i>N</i>-etyylikarbodiimidihydrokloridia. Synteesituotteiden puhdistusmenetelminä käytettiin uudelleen kiteyttämistä ja pylväskromatografiaa. Synteesituotteet analysoitiin NMR:llä, GC-MS:llä, IR-spektrometrillä ja alkuaineanalyyseillä. Lisäksi reaktiotuotteista mitattiin sulamispisteet ja <math>R_f</math>-arvot.</p> <p>Synteesisarjaan suunnitelluista betuliini- ja betulonihappojohdannaisista onnistuivat betuliini-28-ferulihappoesteri, betulonihappo-28-vaniliiniesteri ja betulonihappo-28-karvakroliesteri. Tuotteille on tehty ja tullaan tekemään erilaisia bioaktiivisuustestejä ja näin ollen kaikkia tuloksia ei ole vielä saatu. Osassa testeistä kyseiset tuotteet ovat osoittautuneet jo lievästi aktiivisiksi, joten kyseisten tuotteiden testaamista sekä betuliiniin ja sen johdannaisiin liittyvää syntetiikkaa ja tutkimustyötä kannattaa ehdottomasti jatkaa, koska betuliinijohdannaisilla voi olla ratkaiseva merkitys esimerkiksi sairauksien hoidossa.</p>	
Avainsanat: betuliini, koivun tuohi ja kuori, betulonihappo, esteröinti, terpeni	

## ABSTRACT

Name: Erkki-Johannes Metsälä	
Title: Betulin derivatives	
Date: 7.12.2007	Number of pages: 56
Department: Laboratory sciences	Study Programme: Research
Instructor: Pirjo Napari, MS	
Supervisor: Salme Koskimies, PhD	
<p>The subject of this thesis was betulin derivatives. The aim was to perform series of synthesis, which included esterification of betulin and betulonic acid with different carboxylic acids, terpene alcohols and phenols. The additional aim was to achieve knowledge of bioactive properties and other applications of synthesized betulin derivatives. The experiments were performed as a part of the research-programme (Kuori) of VTT Technical Research Centre of Finland. The purpose of the research-programme Kuori is to find commercial applications for betulin and other tree bark and tree extractive products for instance as pharmaceutical products, pesticides and as starting materials for cosmetics.</p> <p>Betulin is a pentacyclic triterpene alcohol, which can be separated quite efficiently from birch bark by extraction. It has been proved that betulin and its derivatives have medicinal effects for instance anti-inflammatory, antiviral, antimalarial, antitumoral and anti-HIV activeness.</p> <p>here is in practise three reactive groups in betulin, lup-20(29)-ene-3<math>\beta</math>,28-diol, primary hydroxyl group on carbon 28, secondary hydroxyl group on carbon 3 and alkene structure on carbon 20. Betulin derivatives are easily achieved by reactions of these groups.</p> <p>Different esterification methods were selected for betulin and betulonic acid reactions, where catalysts were i.a. <i>p</i>-toluenesulfonic acid, titanium isopropoxide, <i>N,N</i>-dimethyl-4-aminopyridin and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride. Synthesized products were purified with recrystallization and column chromatography. Products were analyzed using NMR, GC-MS, IR-spectroscopy and elemental analysis. In addition, boiling points and <math>R_f</math> values were measured.</p> <p>Betulin and betulonic acid derivatives planned for the series of synthesis, betulin-28-ferulic acid ester, betulonic acid-28-vanillin ester and betulonic acid-28-carvacrol ester, were successful. Bioactivities of the products have been and will be tested in several bioactivity experiments, therefore all the results have not been achieved yet. Products have already been proved to be slightly active in some of the experiments and therefore testing of synthesized products as well as synthetics and study of betulin and its derivatives in general should be continued, because betulin derivatives may play a crucial role for instance in treatment of diseases.</p>	
Keywords: betulin, birch bark, betulonic acid, esterification, terpene	

## SISÄLLYS

### ALKULAUSE

### TIIVISTELMÄ

### ABSTRACT

### LYHENNELUETTELO

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORIAOSUUS</b>	<b>3</b>
2.1	Betuliinin uudelleenkiteytys	4
2.2	Betuliinin hapetus betulonihapoksi Jonesin reagenssilla	4
2.3	Esteröintireaktiot	5
2.3.1	Esteröintireaktio <i>p</i> -tolueenisulfonihappo katalyyttinä	7
2.3.2	Esteröintireaktio titaani(IV)isopropylaatti katalyyttinä	8
2.3.3	Esteröintireaktio <i>N</i> -(3-dimetyyliaminopropyli)- <i>N'</i> -etyylikarbodiimidihydrokloridilla	9
2.3.4	Happokloridin valmistus ja esteröintireaktio 4-( <i>N,N</i> -dimetyyliamino)pyridiini katalyyttinä	11
2.4	Funktionaalisen ryhmän suojaus ja suojauksen poisto	15
2.4.1	Hydroksyyliyhmän suojaus <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyliyhmillä	16
2.4.2	Suojauksen poisto	17
<b>3</b>	<b>TYÖMENETELMÄT</b>	<b>18</b>
3.1	Ohutkerroskromatografia TLC	18
3.2	Pylväskromatografia	19
3.3	NMR-spektroskopia	20
3.4	Sulamispisteen määrittäminen	21
3.5	Muita työmenetelmiä	21

<b>4</b>	<b>SYNTEESIT</b>	<b>24</b>
4.1	Betuliinin uudelleenkiteytys	25
4.2	Betuliinin hapetus betulonihapoksi	26
4.3	Betuliini-28-ferulihappoesteri	28
4.4	Betulonihappo-28-kanelialkoholiesteri	31
4.5	Betulonihappokloridin esteröintireaktiot	32
<b>5</b>	<b>TUOTTEIDEN KARAKTERISOINTI JA TULOKSET</b>	<b>40</b>
5.1	Betuliinin uudelleenkiteytys	40
5.2	Betuliinin hapetus betulonihapoksi	40
5.3	Betuliini-28-ferulihappoesteri	41
5.4	Betulonihappo-28-kanelialkoholiesteri	42
5.5	Betulonihappokloridi ja esteröintireaktiot	43
5.6	Synteesituotteiden bioaktiivisuustestit	50
<b>6</b>	<b>JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>51</b>
	<b>VIITELUETTELO</b>	<b>54</b>
	<b>LIITELUETTELO</b>	<b>56</b>

## LYHENNELUETTELO

<b>(COCl)<sub>2</sub></b>	<b>oksalyylikloridi</b>
<b>DCC</b>	<b>disykloheksyylikarbamidi</b>
<b>DMAP</b>	<b>4-(<i>N,N</i>-dimetyyliamino)pyridiini</b>
<b>DMF</b>	<b>dimetyyliformamidi</b>
<b>EDC</b>	<b><i>N</i>-(3-dimetyyliaminopropyli)-<i>N'</i>-etyylikarbodi-imidihydrokloridi</b>
<b>EDIA</b>	<b>etyylidi-isopropyyliamiini</b>
<b>EtOAc</b>	<b>etyyliasettaatti</b>
<b>EtOH</b>	<b>etanoli</b>
<b><i>p</i>-TsOH</b>	<b><i>p</i>-tolueenisulfonihappo</b>
<b>RT</b>	<b>room temperature = huoneenlämpötila</b>
<b>SOCl<sub>2</sub></b>	<b>tionyylikloridi</b>
<b>TBAF</b>	<b>tetra-<i>n</i>-butyyliammoniumfluoridi</b>
<b>TBDMS</b>	<b><i>tert</i>-butyylidimetyylisilyyli</b>
<b>TEA</b>	<b>trietyyliamiini</b>
<b>THF</b>	<b>tetrahydrofuraani</b>
<b>Ti(O-<i>i</i>-Pr)<sub>4</sub></b>	<b>titaani(IV)isopropylaatti</b>

## 1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena oli bioaktiiviset betuliinijohdannaiset. Työn tarkoituksena oli valmistaa synteesisarja, joka liittyy osana Valtion Teknillisen Tutkimuskeskuksen (VTT) Kuori-tutkimusprojektiin. Kuori-projektin tavoitteena on etsiä betuliinille ja muille puiden kuori- ja uuteaineille kaupallisia käyttökohteita esimerkiksi lääkeaineina, pestisideinä ja kosmetiikka-alan raaka-aineina. Synteesisarjassa pyrkimyksenä oli tuottaa uusia betuliini- ja betulonihappojohdannaisia sekä saada selvyyttä niiden bioaktiivisista ominaisuuksista sekä mahdollisista muista sovelluksista.

Betuliini on luonnossa varsin runsaasti esiintyvä triterpeeni. Erityisesti koivun kuorella ja tuohella on runsaasti betuliinia. Tällä hetkellä metsäyhtiöt eivät ole löytäneet kovinkaan hyvää jälkikäsittelymenetelmää koivusta hakkeena saataville kuorelle ja tuohelle, vaan yleisimmin ne märkäpoltetaan, mikä ei ole kovinkaan taloudellista. Koivun kuoresta ja tuohesta voidaan kuitenkin varsin helposti eristää betuliinia, joka on potentiaalisesti tärkeä raaka-aine polymeereille ja biologisesti aktiivisille yhdisteille. Betuliini saadaan muutettua helposti esimerkiksi betuloni- ja betulinihapoksi, joilla saattaa olla laaja biologinen ja farmakologinen käyttömahdollisuus. [1, s. 1.]

Betuliinilla, betulinihapolla ja sen johdannaisilla on havaittu olevan erityisesti anti-HIV-aktiivisuutta ja ne eivät ole sytotoksia kuten muutamat syövän hoidossa kliinisesti käytetyt lääkeaineet [1, s. 1]. Myös betulonihapolla on todistettu olevan antitumoraalisia, antiviraalisia ja immuunijärjestelmää stimuloivia vaikutuksia [2, s. 331]. Betulonihapolla on havaittu olevan antitumoraalisia vaikutuksia erityisesti eturauhassyöpään [3, s. 6349 - 6358]. Lisäksi betulonihapon on todettu olevan aktiivinen esimerkiksi parasiitin aiheuttamaa Leishmania-tautia vastaan, kasvintorjunta-aineena ja bakteerien kasvua inhiboivana aineena.

Synteesisarjassa betuliini esteröitiin erilaisilla hapoilla ja betulonihappo erilaisilla terpeenialkoholeilla ja fenoleilla. Betuliini, betulonihappo ja terpeenialkoholit ovat kaikki luonnossa esiintyviä bioaktiivisia yhdisteitä joten synteesituotteet saattaisivat olla mahdollisia lääkeaine- ja pestisidikandidaatteja, joiden takia kyseiset johdannaiset herättivät tutkimusryhmässä erityistä mielenkiintoa. Erityisesti haluttiin keskittyä betulonihapon



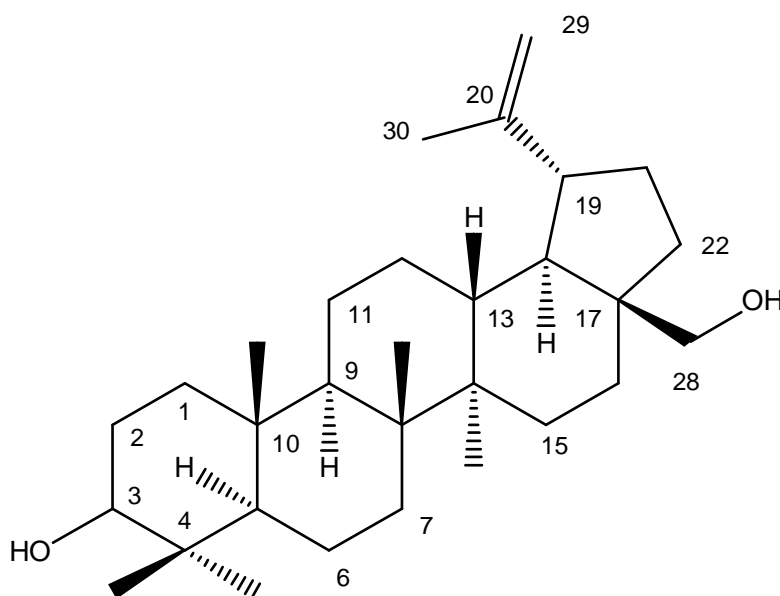
estereihin, koska tutkimusprojektissa aikaisemmin valmistetut esterit olivat suurimmaksi osaksi olleet betuliinin erilaisia estereitä. Betuliinin verrattuna betulonihapon estereillä saattaisi olla myös parempi aktiivisuus, vähäisempi toksisuus tai ne voisivat olla niin sanottuja low-release-tyyppisiä, kun happo vapautuu pikkuhiljaa esterin hydrolysoituessa. Lisäksi betulonihapon esteröinneissä on minimissään vain kaksi reaktiovaihetta, jolloin valmistuskustannukset eivät nousisi liian kalliiksi, jos soveltuvia tuotteita haluttaisiin käyttää kasvintorjunta-aineina.

Kuten aikaisemmin jo todettiin, koivun tuohesta ja kuoresta saatavalla luonnon raaka-aineella betuliinilla ja sen johdannaisilla saattaa olla erittäin laaja-alainen käyttötarkoitus niin biologisissa kuin farmakologisissa sovelluksissa, ja tietyt betuliinijohdannaiset yhdessä tämänhetkisten hoitomenetelmien kanssa ovat selvästi jo osoittautuneet varsin potentiaalisiksi lääkeaineiksi useiden eri tautiryhmien hoidossa. Betuliinista voidaan valmistaa helposti useita erilaisia johdoksia, joista jokin voi olla potentiaalinen kasvintorjunta-aine, raaka-aine muille tuotteille tai vaikkapa lääkeaine, joten betuliiniin ja sen johdannaisiin liittyvä tutkimustyö on erittäin tärkeää.

## 2 TEORIAOSUUS

Betuliini on pentasyklinen triterpeenialkoholi, jolla on lupaaniirunko. Betuliinia voidaan eristää varsin tehokkaasti koivun kuoresta ja tuohesta uuttamalla. Uutossa liuottimena käytetään esimerkiksi kiehuvaa hiilivety-liuotinta, asetonia tai alkoholien vesi-atseotrooppeja. Betuliinisaanto voi olla jopa 30 % kuoren tai tuohen kuivamassasta. [4, s. 100.]

Betuliinissa (kuva 1) on kolme reaktiivista ryhmää, primäärinen hydroksyyli-ryhmä hiilessä 28, sekundäärinen hydroksyyli-ryhmä hiilessä 3 sekä alkeeni-rakenne hiilessä 20, joista jokaisen ryhmän reaktioilla voidaan helposti valmistaa betuliinijohdannaisia.



Kuva 1. Betuliinin, lup-20(29)-ene-3 $\beta$ ,28-dioli, rakennekaava [lähdettä 1, s. 2 mukaillen]

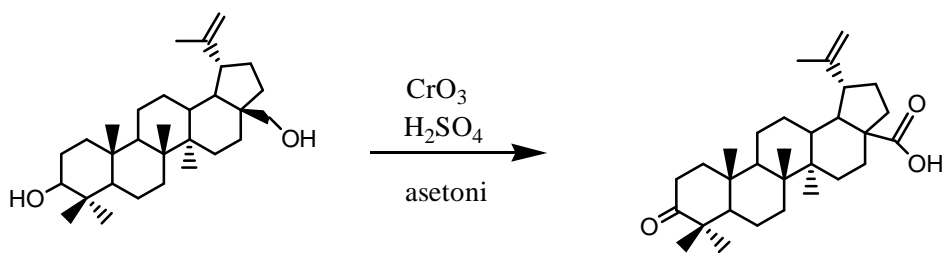
## 2.1 Betuliinin uudelleenkiteytys

Koivun tuohesta ja kuoresta eristetty betuliini sisältää epäpuhtauksina lupeolia ja betuliinihappoa sekä mahdollisia muita yhdisteitä. Eristyksen jälkeen betuliini voi olla esimerkiksi n. 70 %:sta. Betuliinia voidaan puhdistaa esimerkiksi uudelleenkiteytyksellä tai kromatografisesti. Uudelleenkiteytyksessä sopivia liuottimia ovat alkoholit mm. isopropanoli. Uudelleenkiteytyksen jälkeen betuliini on yleensä vähintään 90 %:sta. Betuliini voi olla puhdistuksen jälkeen jopa 95 - 97 %:sta. [5.]

## 2.2 Betuliinin hapetus betulonihapoksi Jonesin reagenssilla

Jonesin reagenssi on hapettava liuos, joka koostuu kromitrioksidista ja väkevästä rikkihaposta. Jonesin reagenssi hapettaa primääriset alkoholit karboksyylihapoiksi ja sekundääriset alkoholit ketoneiksi. Liuottimena reaktiossa käytetään usein asetonia, joka vaikuttaa merkittävästi kromihapon ominaisuuksiin. Hapetusreaktio on erittäin nopea, kohtuullisen eksoterminen, ja saannot ovat tyypillisesti hyviä ja lisäksi Jonesin reagenssi hapettaa vain harvoin tyydyttymättömiä sidoksia. Jonesin reagenssi on erittäin myrkyllistä, joten käsittely ja hävitys käytön jälkeen on suoritettava huolellisesti ja oikein. [6, s. 218; 268.]

Hapetettaessa betuliinia (kuva 2) Jonesin reagenssilla, saadaan tuotteena betulonihappoa saannon ollessa pylväskromatografisen puhdistuksen jälkeen noin 75 % [7, 1608].



Kuva 2. Betuliinin hapetus betulonihapoksi Jonesin reagenssilla [lähde 7, s. 1608 mukaillen]

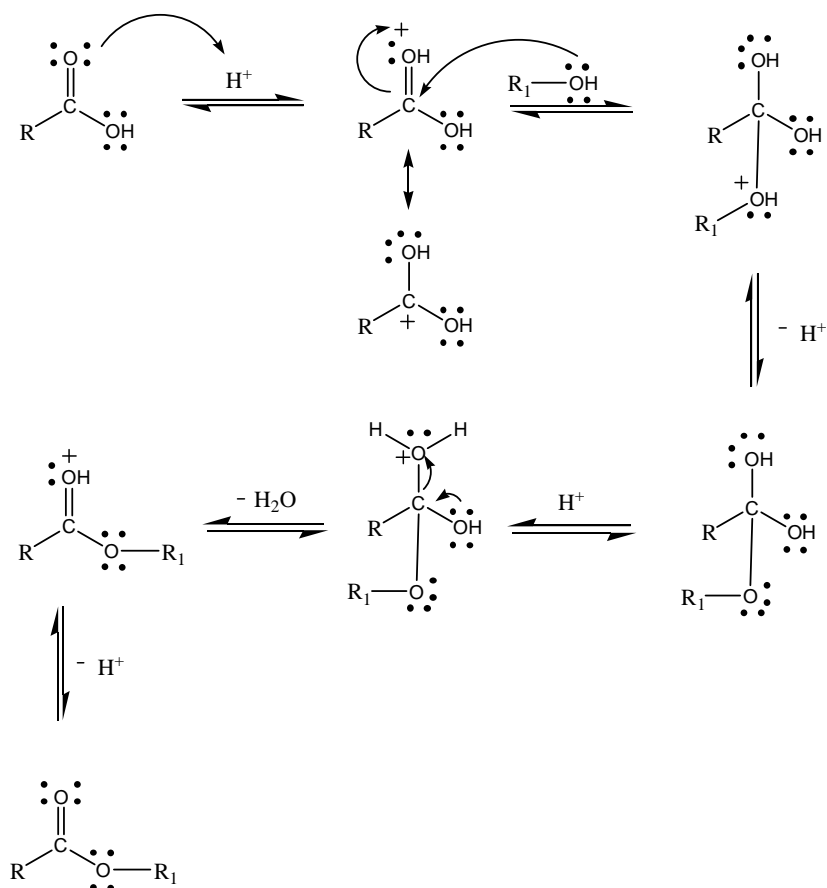
## 2.3 Esteröintireaktiot

Esterit ovat erittäin tärkeitä karboksyylihapojohdannaisia. Ne ovat yhdisteitä, joissa asyyliiryhmä kiinnittyy alkoksiryhmään muodostaen esterisidoksen. Esterit ovat jonkin verran poolisia yhdisteitä, johtuen polaarista karbonyyli-ryhmästä. Estereillä on yleensä matala sulamispiste, koska niillä ei ole vapaita vetyatomeja vetysidosten muodostamiseen. Ne esiintyvät normaalisti nesteinä, mutta myös kidemäisinä ja ovat veteen liukenemattomia yhdisteitä. Monilla estereillä on miellyttävä tuoksu ja monia käytetäänkin aromiaineina ja hajusteina. Lisäksi estereitä käytetään liuottimina. Monet hedelmät ja kukat sisältävät monimutkaisia niille luontaisten estereiden seoksia, jotka antavat niille niiden ominaisen maun ja tuoksun. [8, s. 543 - 544.]

Estereitä voidaan valmistaa useilla eri menetelmillä. Yleisin menetelmä on happokatalysoitu Fischer-esteröinti. Toinen yleinen menetelmä on alkoholin asylointireaktio, esimerkiksi happokloridin tai happoanhydridin avulla, joka on helppo toteuttaa varsinkin pienessä mittakaavassa. [8, s. 553 - 556.]

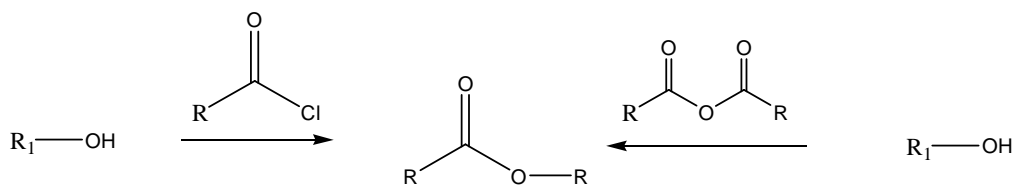
### *Fischer-esteröinti*

Fischer-esteröinti (kuva 3) on yleisin tapa valmistaa estereitä. Esteröinnissä karboksyylihappoa ja alkoholia kuumennetaan katalyytin ollessa rikkihappo, fosforihappo, p-tolueenisulfonihappo tai jokin Lewis-happo. Reaktio toimii useimmilla karboksyylihapoilla, mutta alkoholien tulisi olla primäärisiä tai sekundaarisia. Steerisesti estyneiden lähtöaineiden ja fenolien esteröinneissä menetelmä on huono ja yleensä tällöin esteröinti tehdään happokloridin tai happoanhydridin avulla. Suurimpana ongelmana Fischerin-reaktiossa on veden muodostuminen, mikä johtaa esterin hydrolysoitumiseen, jos veden määrä on riittävän suuri. Hydrolysoitumista voidaan estää poistamalla vesi esimerkiksi Dean & Stark-osalla tai jompaakumpaa lähtöaineista voidaan käyttää ylimäärin, jolloin reaktio etenee lopputuotteen suuntaan. [8, s. 556.]



Kuva 3. Fischer-esteröintin reaktiomekanismi [lähde 8, s. 557 mukaillen]

Kuvassa 4 on esitetty alkoholin asylointireaktio happokloridin ja happoanhydridin avulla. Reaktiossa nukleofiilinen alkoholi hyökkää karbonyylihiileen aloittaen nukleofiilisen asyylisubstituutioreaktion.

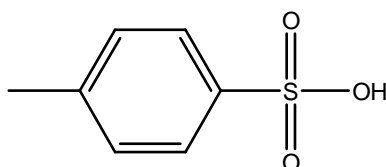


Kuva 4. Esterin valmistus happokloridin ja happoanhydridin kautta [lähde 8, s. 553 mukaillen]

Esteröintiä happokloridin avulla esitellään tarkemmin opinnäytetyön kohdassa 2.3.4 *Happokloridin valmistus ja esteröintireaktio 4-(N,N-dimetyyli-amino)pyridiini katalyyttinä.*

### 2.3.1 Esteröintireaktio *p*-tolueenisulfonihappo katalyyttinä

*p*-Tolueenisulfonihappo (kuva 5) on yksi yleisimmin käytetyistä orgaanisista happokatalyyteistä, kun reaktiossa käytetään poolittomia liuottimia [9, s. 4940].

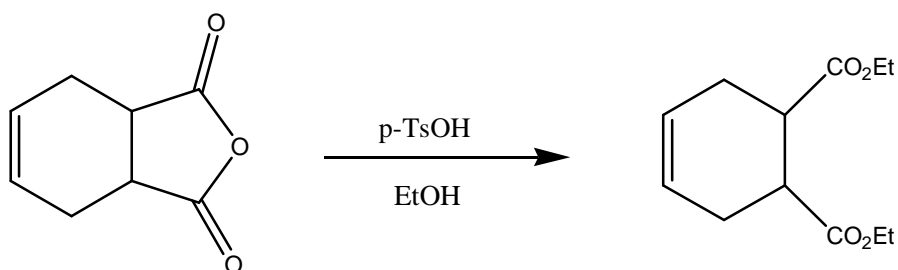


Kuva 5. *p*-Tolueenisulfonihapon rakennekaava

*p*-Tolueenisulfonihappoa (*p*-TsOH) käytetään usein orgaanisen kemian happokatalysoiduissa ja transformaatioreaktioissa, mm. esteröinneissä, asetaalien muodostamisessa, veden lohkaisureaktioissa, enolieetterien ja asetaattien synteeseissä, uudelleenjärjestäytymis- ja isomeroitiprosesseissa. [9, s. 4940.]

Happokatalysoiduissa karboksyylihappojen Fischer-esteröinneissä *p*-tolueenisulfonihappoa voidaan käyttää mineraalihappojen sijasta [9, s. 4940].

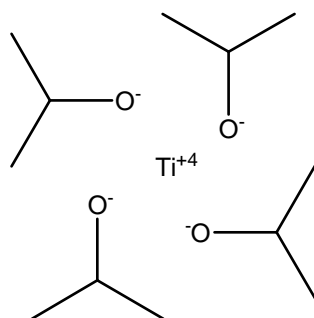
Esteröintireaktiossa *p*-TsOH:lla (kuva 6) muodostuu sivutuotteena vettä, joka erotetaan reaktioseoksesta Dean & Stark-osalla pois, jolloin reaktion tasapaino siirtyy lopputuotteen suuntaan.



Kuva 6. Karboksyylihappojen esteröinti *p*-tolueenisulfonihappokatalyytillä [lähdettä 9, s. 4941 mukailen]

### 2.3.2 Esteröintireaktio titaani(IV)isopropylaatti katalyyttinä

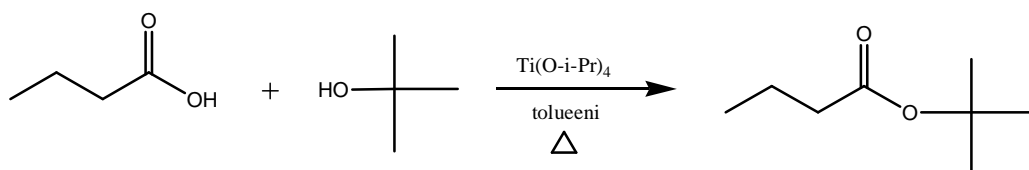
Titaani(IV)isopropylaatti (kuva 7) on heikko Lewis-happo, jota käytetään katalyyttinä vaihtoesteröintireaktiossa, nukleofiilisten lohkeamisten muodostamiseen 2,3-epoksialkoholeilla ja isomerisaatioreaktioihin sekä apuaineena erilaisissa karbonyyliyhdisteiden ja  $\alpha,\beta$ -tyydyttymättömien karbonyyliyhdisteiden nukleofiilisissä additioreaktiossa. [9, s. 4932.]



Kuva 7. Titaani(IV)isopropylaatin rakennekaava

Titanaatteja käytetään myös varsin yleisesti homogeenisinä katalyytteinä molekyylipainoltaan suurien esteriyhdisteiden valmistukseen niiden korkean konversioasteen takia ja vähäisen happamuuden takia. Kineettisten tutkimuksien mukaan titanaatit toimivat tehokkaammin korkeissa lämpötiloissa kuin matalissa. [10, s. 139.]

Kuvassa 8 on esitetty esteröintireaktio, jossa titaani(IV)isopropylaatti toimii katalyyttinä. Reaktiossa syntyvä vesi poistetaan Dean & Stark-osalla, jolloin estetään esterin hydrolyysi ja reaktiotasapaino siirtyy lopputuotteen suuntaan.



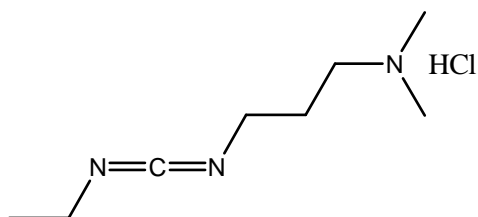
Kuva 8. Titaani(IV)isopropylaatti esteröintireaktion katalyyttinä [lähde 10, s. 139 mukaillen]

### 2.3.3 Esteröintireaktio *N*-(3-dimetyyliaminopropyyli)-*N'*-etyylikarbodi-imidihydrokloridilla

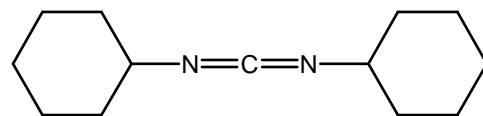
Karbamidit ovat yhdisteitä, joista hydrolysoituessaan muodostuu ureaa. Orgaanisessa kemiassa karbamideja käytetään kuivausaineina ja kytkentä-reagensseina karboksyylihappojen esteri- ja amidireaktioissa. [9, s. 1751.]

*N*-(3-dimetyyliaminopropyyli)-*N'*-etyylikarbodi-imidihydrokloridi (EDC) ja 1,3-disykloheksyylikarbamidi (DCC), joiden rakennekaavat on esitetty kuvassa 9, ovat molemmat karbamidijohdannaisia. Niitä käytetään yleisesti peptidisyntetiikassa ja valmistettaessa amideja primäärisistä ja sekundäärisistä amiineista. Molempia käytetään myös yleisesti kytkentä-reagensseina esterisidosten syntetisoimiseen karboksyylihappojen ja alkoholien välillä. Molemmilla reagensseilla saannot ovat korkeita, hinta melko edullinen ja saatavuus hyvä. [9, s. 1751; 2430 - 2431.]

**EDC**



**DCC**



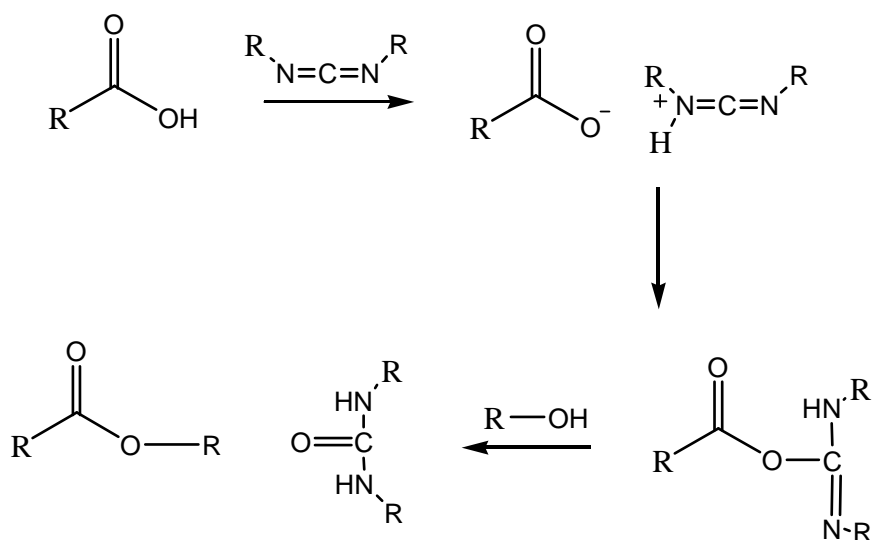
Kuva 9. EDC:n ja DCC:n rakennekaavat [lähde 9, s. 1751; 2430 mukaillen]

DCC:n käytössä verrattuna EDC:n käyttöön on muutamia haittapuolia. Reaktion sivutuotteena syntyvän *N,N'*-disykloheksyyliurean erottaminen on vaikeaa ja yleensä sitä jää jonkin verran lopputuotteeseen, THF:n ja DMF:n käyttö liuottimina heikentää reaktioita ja lisää *N*-asyyliureasivutuotteiden muodostumista sekä kiraalisten karboksyylihappojen rasemisaatiota. Lisäksi DCC:n on todettu aiheuttavan allergisia reaktioita joutuessa kosketuksiin ihon kanssa. EDC:n etu verrattuna DCC:n käyttöön on, että EDC:n reaktioissa muodostuva urea on vesiliukoista ja näin ollen huomattavasti helpompi erottaa lopputuotteesta, mutta myös EDC on potentiaalinen allergeeni, joten kosketusta ihon ja silmien kanssa tulee välttää. [9, s. 1751; 2430 - 2431.]



Yleinen ongelma karbamidien käytössä kytkentäreagensseina on O-asyyli-isourea-väliuotteen muodostuminen. Väliuotteesta voi muodostua *N*-asyyliureaa, joka lisää tuotteiden kontaminaatiota ja vähentää saantoa. Lisäksi siitä saattaa muodostua 5(4H)-oksatsolonia, joka tautomerisoituu helposti rasemaateiksi. Käyttämällä heikkoja dielektrisiä liuottimia kuten dikloorimetaania tai apuaineita O-asyyli-isourean sitomiseen, voidaan sivutuotteiden muodostumista vähentää. [9, s. 2430 - 2431.]

Esteröintireaktioissa käytetään EDC:tä yleensä ekvivalenttisia määriä tai pientä ylimäärää esim. 1.1 ekv. Reaktio (kuva 10) tapahtuu huoneenlämmössä reaktioajan ollessa kohtuullisen pitkä ja liuottimena käytetään dikloorimetaania. [9, s. 2430.] Etyylidi-isopropyyliamiinia (EDIA) voidaan käyttää reaktiossa emäksenä trietyyliamiinin (TEA) tapaan, sitomaan reaktiossa muodostuvaa suolahappoa. Reaktiossa muodostuu esteriä ja ureaa.



Kuva 10. Karbamidin toiminta kytkentäreagenssina esteröintireaktiossa [lähdettä 11, s. 896 mukaillen]

### 2.3.4 Happokloridin valmistus ja esteröintireaktio 4-(N,N-dimetyyliamino)pyridiini katalyyttinä

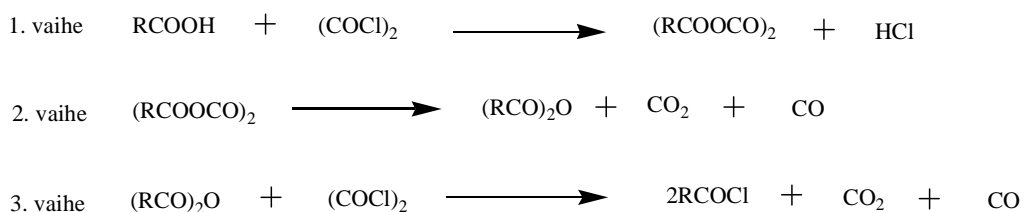
Happokloridit ovat reaktiivisimpia karboksyylihapojohdannaisia, ja juuri tämän takia niistä voidaan helposti valmistaa muita johdannaisia. Happokloridit reagoivat varsin helposti veden kanssa muodostaen karboksyylihappoa ja suolahappoa. Reaktiivisuutensa takia happoklorideista voidaan valmistaa estereitä, amideja ja amiineja reaktio-olosuhteiden ollessa oikeat. Happoklorideilla onkin erittäin tärkeä merkitys karboksyyli-happojohdannaisten kemiassa. [11, s. 626.]

#### *Happokloridin valmistus*

Karboksyylihappokloridit ovat karboksyylihapojohdannaisista epävakaimpia, ja sen takia niitä ei voida suoraan valmistaa muista happojohdannaisista yksinkertaisella nukleofiilisella substituutioreaktiolla. Usein happoklorideja valmistetaan käyttämällä erittäin helposti reagoivia rikkihappojohdannaisia kuten esimerkiksi tionyylikloridia ( $\text{SOCl}_2$ ). [11, s. 627.]

Happoklorideja voidaan valmistaa myös erittäin reaktiivisen oksalyylikloridin avulla ( $\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$ ). Kuumennettaessa alifaattisia tai aromaattisia happoja oksalyylikloridin (2,5 ekv.) kanssa tapahtuu nopea ja kvantitatiivinen reaktio, jossa kyseessä olevasta haposta saadaan vastaavaa happokloridia. [13, s. 599.] Menetelmää on kokeiltu useilla erilaisilla orgaanisilla hapoilla ja saannot ovat olleet yleensä erittäin korkeita, jopa yli 95 % [12, s. 604].

Kuvassa 11 on esitetty oksalyylikloridilla valmistetun happokloridin reaktiomekanismi.



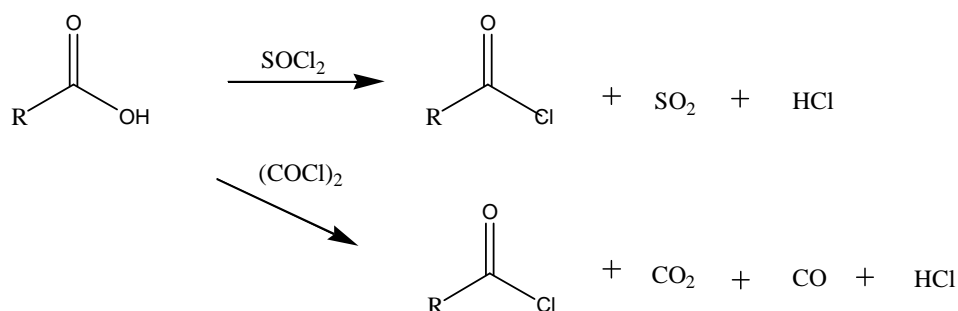
*Kuva 11. Reaktiokaavio oksalyylikloridilla valmistetulla happokloridille [lähde: 12, s. 601 mukailen]*

Ensimmäisessä vaiheessa syntyy kaksoisanhydridi, joka toisessa vaiheessa hajoaa karboksyylihapon anhydridiksi ja reagoidessaan kolmannessa vaiheessa oksalyylikloridin kanssa, anhydridi konvertoituu sitä vastaavaksi happokloridiksi. [12, s. 601].

Oksalyylikloridi on happokloridin valmistuksessa erittäin hyvä reagenssi, sillä sivutuotteina reaktiossa syntyy vain haihtuvia kaasuja, suolahappoa, hiilidioksidia ja hiilimonoksidia sekä lisäksi oksalyylikloridi on hiukan selektiivisempi ja hellävaraisempi reagenssi kuin tionyyliklorodi. [13, s. 12.]

Oksalyylikloridi ja sen reagoidessa syntyvät haihtuvat sivutuotteet sekä itse happokloridi ovat haitallisia tai erittäin haitallisia terveydelle ja tämän takia niiden käsittelyn tulee olla huolellista ja oikeanlaista.

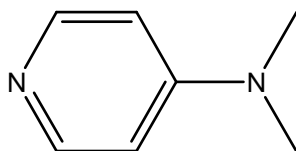
Kuvassa 12 on esimerkki tionyylikloridin ja oksalyylikloridin käytöstä happokloridin valmistuksessa ja reaktiossa muodostuvista kaasumaisista sivutuotteista.



*Kuva 12. Happokloridin valmistus tionyylikloridilla tai oksalyylikloridilla [lähde 13, s. 12 mukailen]*

### *Esteröintireaktio 4-(N,N-dimetyyliamino)pyridiini-katalyytillä*

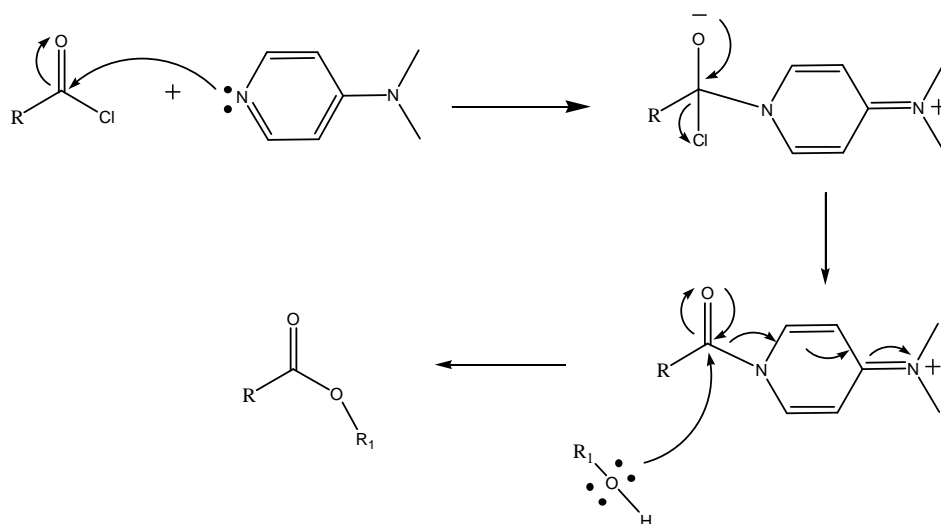
4-(N,N-dimetyyliamino)pyridiini (kuva 13), DMAP, on nukleofiilinen katalyytti, joka toimii katalyyttinä useissa erilaisissa reaktioissa. Vasta 1960-luvun lopussa DMAP:n havaittiin olevan huomattavasti tehokkaampi katalyytti asetyloitireaktiossa kuin aikaisemmin käytetty pyridiini. Kohtuullisen hintansa ja hyvän saatavuutensa takia DMAP:sta on tullut yksi käytetyimmistä katalyyteistä bio-, polymeeri- ja analyyttisen kemian sekä orgaanisen kemian alalla. Useita maatalous- ja lääketieteellisuuden tuotteita on tuotettu käyttäen DMAP:n erittäin hyvää kykyä katalysoida mm. erilaisten alkoholien, amiinien, fenolien, tiolien, sokereiden ja terpeenien reaktioita sekä useita muita reaktioita. [14.]



*Kuva 13. 4-(N,N-dimetyyliamino)pyridiinin rakennekaava*

Kirjallisuudessa esitetään useita esteröintireaktioita, joissa käytetään DMAP:tä yleensä katalyyttisiä määriä (20:1), mutta vaikeammissa asyloitireaktioissa sitä voidaan käyttää ekvivalenttisia määriä, jolloin tarkoituksena on poistaa reaktiossa sivutuotteena muodostuvia happoja. DMAP:n käytön etuja ovat: saanto paranee selvästi, reaktio nopeutuu ja lisäksi se mahdollistaa hellävaraiset olosuhteet herkkiin reaktioihin ja näin ollen vähentää ei-toivottuja sivutuotteita, esimerkiksi rasemaattien muodostumista. [15.]

Kuvassa 14 on esitetty DMAP:n toimintamekanismi esteröintireaktiossa.



Kuva 14. DMAP:n toimintaperiaate [lähdettä 16, s. 8 - 9 mukaillen]

DMAP:n toimintamekanismi perustuu siihen, että kiinnittyessään  $\alpha$ -hiileen se reagoi herkemmin ja lähtee helpommin kuin happokloridin kloori, mahdollistaen steerisesti estyneempien, sekundääristen ja tertiääristen alkoholien esteröinnit.

#### *In-situ happokloridiesteröiminen*

In-situ-reaktiolla tarkoitetaan kemiassa samassa reaktioseoksessa peräkkäin tapahtuvia synteesejä. In-situ-menetelmää käytetään usein, kun reaktiossa käytetään epästabiileja yhdisteitä.

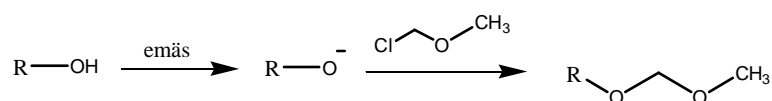
Opinnäytetyössä käytetty happokloridin esteröiminen in-situ tehtiin huoneenlämmössä reaktioajan ollessa noin 20 h. Liuottimena käytettiin tetrahydrofuraania ja reaktio-olosuhteiden säätämiseen suotuisiksi käytettiin dimetyyliformamidiä (DMF). Menetelmässä betulonihaposta valmistettiin oksalyylidikloridilla betulonihappokloridia, jonka jälkeen reaktioseokseen lisättiin THF:ään liuotettu  $\alpha$ -terpinoli. In-situ-reaktiovaiheen jälkeen tuote uutettiin orgaaniseen liuottimeen, pestiin ja kuivattiin. [17, s. 4293 - 4294].

## 2.4 Funktionaalisen ryhmän suojaus ja suojauksen poisto

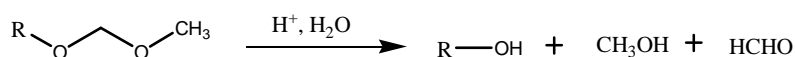
Kun yhdisteillä, joissa on useita funktionaalisia ryhmiä, halutaan tehdä selektiivinen kemiallinen reaktio vain yhdessä reagoivassa ryhmässä, täytyy muut reagoivat ryhmät suojata. Suojaavalta ryhmältä vaaditaan useita ominaisuuksia. Suojaavan reagenssin tulee reagoida selektiivisesti, saannon on oltava hyvä, sen tulee estää jatkoreaktiot, se voidaan poistaa selektiivisellä reaktiolla saannon ollessa hyvä, ja purkuun käytetty reagenssi ei saa reagoida suojatun ryhmän kanssa eikä olla myrkyllinen. Suojaavan ryhmän tulisi muodostaa kidemäinen johdannainen, joka on helposti eristettävissä sivutuotteista ja lisäksi suojaryhmällä tulisi olla mahdollisimman vähän reagoivia ryhmiä, jolloin vältetään mahdolliset muut reaktiot. [18, s. 1.]

Kuvassa 15 on esitetty tyypillinen alkoholin suojaus ja suojauksen poisto

### Suojaus



### Suojauksen poisto



Kuva 15. Funktionaalisen ryhmän suojaus ja suojauksen poisto [lähde: 19, s. 350 - 351 mukailen]

Suojaryhmää valittaessa tulee ottaa huomioon yksityiskohtaisesti kaikki reagoivat aineet, reaktio-olosuhteet ja kohdemolekyylissä olevat funktionaalisuudet. Suunnittelun tulee siis olla täsmällistä ja huolellista synteesin alusta loppuun saakka. [18, s. 4.]

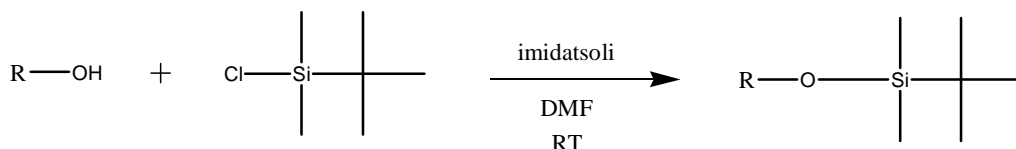
Yleisesti käytettyjä alkoholin suojaryhmiä ovat mm. asetyyli, metoksimetyylieetteri, metyylitiometyylieetteri, tetrahydropyraani ja silyylieetterit. Karboksyylihapoilla yleisesti käytettyjä suojaryhmiä ovat mm. metyyliesterit, bentsyyliesterit, *tert*-butyyliesterit ja silyyliesterit. [18.]

### 2.4.1 Hydroksyyli­ryhmän suojaus tert-butyyli­dimetyylisilylryhmällä

Tert-butyyli­dimetyylisilylieetteri (TBDMS) on yksi yleisimmin käytetyistä kemiallisen syntetiikan silylisuojaryhmistä. TBDMS-eetteriä on helppo käyttää ja se soveltuu useimpien reagenssien kanssa, pysyy kohtuullisen stabiilina useimmissa orgaanisissa reaktioissa ja saadaan helposti poistettua olosuhteilla, jotka eivät vaikuta lopputuotteen muihin funktionaalisiin ryhmiin. Verrattuna trimetyylisilyyliin (TMS), jota käytetään varsin usein myös suojaryhmänä, TBDMS-eetteri on hydrolyysireaktioissa  $10^4$  kertaa stabiilimpi. TBDMS-eetteri on erittäin stabiili emäksisissä olosuhteissa, mutta suhteellisen herkkä happamissa olosuhteissa. [18, s. 77.]

Suojaryhmän liittämiseen ja poiston helppouteen vaikuttavat steeriset tekijät, jotka usein mahdollistavat selektiivisen käytön polyfunktionaalisilla molekyyli­illä, joissa rakenteiden sisällä on steerisiä eroavaisuuksia. TBDMS:ää on helppo käyttää myös sekundääristen hydroksyyli­ryhmien suojaamiseen. TBDMS-ryhmän suojauksen poisto tapahtuu emäksisellä fluoridi-ionilla. TBDMS-ryhmän kulkeutuminen on riippuvainen liuottimesta, mitä proottisempi liuotin, sitä nopeammin reaktio etenee. [18, s. 77.]

Alkoholien suojaamiseen käytetään yleensä TBDMSCl:ää, imidatsolia, dimetyyliformamidia 25 °C lämpötilassa reaktioajan ollessa 10 h. Menetelmälle (kuva 16) on yleensä korkeat saannot, ja parhaiten se toimii erittäin konsentroiduissa liuoksissa. Menetelmä silyloi myös fenoleita, hydroperoksiedeja ja hydroksyyliamiineja. Kyseisissä olosuhteissa tiolien, amiinien ja karboksyyli­happojen suojaaminen ei ole kovinkaan tehokasta. [18, s. 77.]

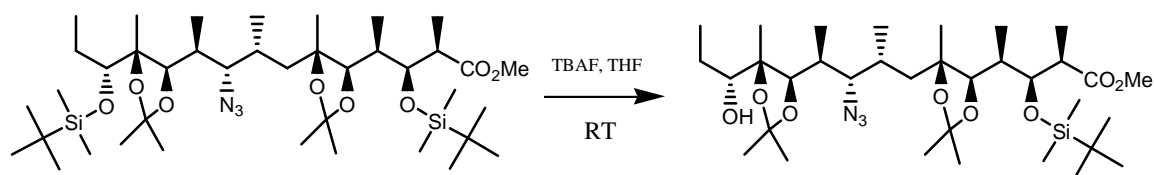


Kuva 16. Primäärisen alkoholin suojaaminen TBDMS-ryhmällä [lähde: 20, s. 127 - 141 mukailen]

### 2.4.2 Suojauksen poisto

Suojaus voidaan poistaa tehokkaasti käyttämällä tetra-*n*-butyyliammoniumfluoridia (TBAF) olosuhteissa, joissa liuottimena on tetrahydrofuraani, 25 °C lämpötila ja yhden tunnin reaktioaika. Saanto kyseisellä menetelmällä on yleensä suurempi kuin 90 %. Fluoridi-ioni on erittäin emäksinen erityisesti vedettömissä olosuhteissa ja voi näin ollen aiheuttaa sivureaktioita emäsherkille substraateille. Aromaatista TBDMS-eettereistä suojaus voidaan poistaa samalla menetelmällä, kuin alkyyli-TBDMS-suojasta purettaessa. [18, s. 80.]

Kuvassa 17 on esimerkki TBDMS-suojaryhmän poistosta. Esimerkissä toinen suojaryhmistä on sterisest estyneempi, jolloin vain toinen suojaryhmistä poistuu.



Kuva 17. Suojaryhmän poisto TBAF:lla [lähde 18, s. 81 mukaillen]



### 3 TYÖMENETELMÄT

#### 3.1 Ohutkerroskromatografia TLC

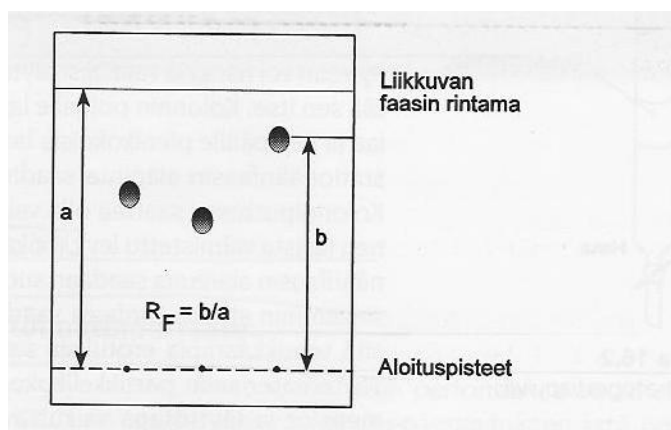
Ohutkerroskromatografia (Thin Layer Chromatography, TLC) on ohuen levyn pinnalla suoritettava kromatografinen menetelmä, jossa tutkittava seos liikkuu huokoisessa aineessa (silikageeli,  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  tai alumiinioksidi,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) liuottimen avulla. Yhdisteiden eluoitusjärjestys riippuu niiden koosta ja poolisuudesta suhteessa eluentin poolisuuteen. Eluoitusjärjestystä voidaan säädellä muuttamalla eluentin koostumusta, lisäämällä esimerkiksi poolisen liuottimen osuutta eluointiliuoksessa.

TLC on nopea, yksinkertainen ja edullinen analyttinen menetelmä, jossa aluminalevy tai lasi- tai muovilevy on päällystetty ohuella adsorptio-ainekerroksella.

TLC:llä voidaan seurata reaktion etenemistä kvalitatiivisesti. Lisäksi sitä käytetään tuotteiden analysoinnissa ja kehitettäessä optimiolosuhteita pylväs- tai nestekromatografiaa varten.

Työmenetelmissä TLC-levyinä käytettiin Silica Gel 60 F254 -levyjä. Levyjä tarkasteltiin UV-lampulla ( $\lambda=254 \text{ nm}$ ). Värjäysliuoksena käytettiin 5 %:sta rikkihappo/metanoli-seosta.

Kuvassa 18 on esitetty tutkittavan yhdisteen indentifiointiin käytetyn hidastustekijän eli  $R_F$ -arvon määrittäminen, jossa  $a$  on liikkuvan faasin kulkema matka ja  $b$  on analyytin kulkema matka levyllä.



Kuva 18.  $R_F$ -arvon määrittäminen [lähde 21, s. 151 mukaillen]

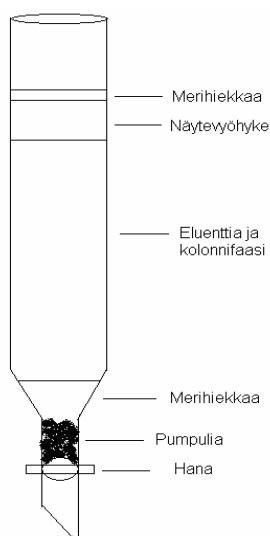
### 3.2 Pylväskromatografia

Pylväskromatografia on pylvään (kuva 19) avulla suoritettava kromatografinen erotusmenetelmä. Pylväskromatografiassa on kaksi faasia; paikallaan pysyvä stationäärifaasi ja liikkuva faasi, joiden välillä aineiden erottuminen tapahtuu. Pylväskromatografiassa stationäärifaasina toimii adsorbanssigeeli, yleensä silikageeli tai alumiinioksidi ja liikkuvana faasina jokin liuotin tai liuotinseos.

Pylväskromatografiassa raakatuote eluoidaan soveltuvalla liuottimella tai liuotinseoksella pylvääksi pakatun adsorbentin läpi, jolloin eri tavoin pylvääseen pidätyvät yhdisteet tulevat eri aikoina pylväästä ulos. Sopivan eluentin valintaan käytetään yleensä ohutkerroskromatografiaa (TLC).

Pylväskromatografiaa käytetään näytteen puhdistukseen ja fraktiointiin. Orgaanisten yhdisteiden syntetiikassa on erittäin tavallista, että reaktiossa syntyy toivotun yhdisteen ohella sivutuotteita, joiden fysikaaliset ominaisuudet poikkeavat halutusta tuotteesta ja lähtöaineista vain vähän. Oikein valitussa kromatografisessa systeemissä saadaan rakenteeltaan hyvinkin samankaltaiset yhdisteet useimmiten erotettua toisistaan.

Työmenetelmissä käytetty silika oli Silica kieselgel 60 partikkelikoon ollessa 0,040 – 0,063 mm ja eluoitusjärjestystä ja nopeutta säädeltiin muuttamalla eluentin koostumusta, lisäämällä esimerkiksi poolisen liuottimen osuutta eluointiliuoksessa.



Kuva 19. Kromatografiapylväs [lähde 21, s. 152 mukailen]

### 3.3 NMR-spektroskopia

Ydinmagneettista resonanssispektroskopiaa (NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy) käytetään pääasiallisesti orgaanisten yhdisteiden rakennemäärittelyyn. Tekniikka perustuu atomiytimien käyttäytymiseen magneettikentässä. Jos ytimessä on parillinen määrä protoneja ja neutroneja, sillä ei ole magneettisia ominaisuuksia eikä NMR-spektriä. Esimerkiksi hiilen ja hapen tavallisimmat isotoopit eivät aiheuta signaalia, sillä  $^{12}\text{C}$ -ytimessä on kuusi protonia ja kuusi neutronia ja  $^{16}\text{O}$ -ytimessä kahdeksan protonia ja kahdeksan neutronia. NMR-signaali saadaan sitä vastoin esimerkiksi  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{19}\text{F}$ - ja  $^{31}\text{P}$ -ytimistä. Tavallisimmassa rakenneanalyyseissä mitataan  $^1\text{H}$ NMR- ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit. [22, s. 656 - 657.]

#### *Kemiallinen siirtymä ja spin-spin-kytkentä*

Tutkittavan yhdisteen protonit resonoivat eri taajuuksilla sen mukaan, minkälainen protonin lähiympäristö on. Molekyylin elektronit joutuvat ulkoisessa magneettikentässä kiertoliikkeeseen, mikä vaikuttaa protonin kokemaan magneettikenttään, yleensä pienentäen sitä. Varjostusvakion  $\sigma$  suuruuteen vaikuttavat protonin lähiympäristössä olevat sidokset ja naapuriatomit. Esimerkiksi protonin lähellä oleva elektronegatiivinen atomi kloori pienentää protonin elektronitiheyttä ja varjostusta siirtäen sen signaalin paikkaa alakentälle. Varjostusvakion pienentyessä, protoni siis kokee suuremman magneettikentän ja sen resonanssitaajuus kasvaa ja signaali muodostuu tiettyyn paikkaan riippuen siitä, minkälainen protonin lähiympäristö on. [21, s. 116.] Kemiallinen siirtymä kuvaa siis kemiallisen lähiympäristön vaikutusta protoniin.

NMR-laitteen magneettikenttä jakaa ytimet eri energiatiloihin. Spektrin mittauksessa sähkömagneettinen säteily siirtää ytimiä näiden energiatilojen välillä joko sen suuntaisesti ( $\alpha$ -ydin, spin-arvo =  $\frac{1}{2}$ ) tai sitä vastaan ( $\beta$ -ydin, spinarvo =  $-\frac{1}{2}$ ). Spinsysteemissä jokainen spin on voimakkaan magneettikentän lisäksi vuorovaikutuksessa myös viereisten spinien magneettikenttien kanssa, jolloin jokainen spin resonoi hieman eri taajuudella. Spin-spin-kytkennän avulla voidaan selvittää viereisissä hiiliatomeissa olevien vetyatomien lukumäärä.

Kemiallisen siirtymän ja spin-spin-kytkennän seurauksena NMR-spektri kuvaa molekyylin rakennetta ja ympäristöä.

Opinnäytetyössä NMR-spektrit mitattiin Varian Mercury-VX-spektrometrillä (300 MHz, 5 mm <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F/<sup>13</sup>C/<sup>31</sup>P, autoswitchable PFG Probe, USA) ja tulosten analysoinnin apuna käytettiin ACD/HNMR predictor ja ACD/CNMR predictor ohjelmistojen spektriennusteita.

### 3.4 Sulamispisteen määrittäminen

Puhtaalla kiteisellä aineella on tietty sulamispiste, toisin sanoen se sulaa eli nesteytyy määrättyssä lämpötilassa. Aivan puhdas yhdiste sulaa tarkalleen samassa lämpötilassa. [23, s. 118.]

Sulamispisteen määrittämistä käytetään orgaanisen yhdisteen puhtauden tarkistamiseen, tuntemattoman yhdisteen tunnistamiseen ja uuden yhdisteen luonnehtimiseen. Epäpuhtaudet yleensä alantavat orgaanisen yhdisteen sulamispistettä. On kuitenkin poikkeuksia, joissa epäpuhtaudet eivät alenna sulamispistettä: esimerkiksi, jos aineet ovat kemiallisesti hyvin erilaisia, jolloin ne eivät sulassakaan tilassa liukene toisiinsa, aineet ovat isomorfisia keskenään, tai jos aine hajoaa sulassa. [23, s. 118]

Sulamispisteiden määrittämiseen työssä käytettiin Sanyo Gallenkamp –laitetta.

### 3.5 Muita työmenetelmiä

#### *MS-mittaukset*

Massaspektrometrin yleisin käyttötarkoitus on tutkittavan yhdisteen molekyylipainon selvittäminen. Massaspektrometria perustuu kemialliseen manipulaatioon, jossa neutraaleja molekyylejä ionisoidaan pommittamalla niitä esimerkiksi elektroneilla tai kaasumaisilla ioneilla, ja muodostuneet ionit punnitaan. Massaspektrometrin avulla voidaan todeta, että onko haluttua tuotetta saatu eli löytyykö toivottua massapiikkiä. Massaspektrometriä käytetään rutiinimenetelmänä yhdisteen rakenteen tunnistamisessa yhdessä muiden spektrometrinen menetelmien kanssa. Massaspektrometri on usein liitettyä kaasu- tai nestekromatografiin jolloin seoksen eri komponentit saadaan eroteltua ja analysoitua erikseen.

Opinnäytetyön tuotteiden MS-mittaukset teki VTT:n analyttisen kemian laboratorio. Laitteistoina mittauksissa käytettiin Bruker Daltonik Esquire-HPLC spektrometriä, jossa kolonnina oli XTerra MS RP18 column (4.6 × 30

mm, 2.5  $\mu\text{m}$ ) sekä JEOL JMS-AX505 (Tokyo, Japan) spektrometriä suorasyöttö- ja elektroni-ionisaatiomenetelmillä.

### *IR-mittaukset*

Orgaanisessa kemiassa infrapuna-spektrometriaa käytetään reaktioiden seurannassa, yhdisteiden tunnistamisessa ja molekyylien rakenteiden selvittämisessä, yhdessä muiden spektrometrinen menetelmien kanssa.

Infrapunasäteily on sähkömagneettista säteilyä. Kun IR-säteily kohtaa värähtelevän molekyylin, jossa on samoja taajuuksia kuin millä molekyyli itse värähtelee, ko. taajuudet absorboituvat ja värähtelyn amplitudi kasvaa Tätä sähkömagneettisen säteilyn vuorovaikutusta molekyylijoukon kanssa voidaan tutkia mittaamalla infrapunasäteilyn absorptiota eli IR-spektri. Absorptio näkyy mitatussa IR-spektrissä absorptiojuovana kyseistä energiaa vastaavalla aaltolukuarvolla. IR-spektri saadaan rekisteröimällä absorboituneen säteilyn intensiteetti aaltoluvun funktiona. Kaikki molekyylit eivät kuitenkaan absorboi IR-säteilyä värähtelytaajuudellaan. Edellytyksenä on, että molekyylin värähtely on IR-aktiivista, eli molekyylin värähtelyllä on muuttuva dipolimomentti. Koska molekyylit absorboivat säteilyä tietyillä taajuuksilla, on jokaisella yhdisteellä sille ominainen, yleensä paljon yksityiskohtia sisältävä IR-spektrinsä.

Opinnäytetyön tuotteiden IR-mittaukset tehtiin Helsingin ammattikorkeakoulu Stadian Perkin Elmer IR-laitteistolla. Lisäksi IR-mittauksia tehtiin Helsingin Yliopiston Bruker Vertex 70 spektrometrillä (Pike MIRacle diamond crystal) sekä Bruker Equinox 55 spektrometrillä (IRScope II and diamond anvil).

*Alkuaineanalyysi*

Alkuaineanalyysiä käytetään tuotteen puhtauden tarkistamiseen ja täydentämään muita analyttisiä menetelmiä. Alkuaineanalyysillä määritetään orgaanisen yhdisteen hiili-, vety- ja typpipitoisuuksia, myös rikki- ja happipitoisuuksia on mahdollista määrittää. Alkuaineiden määrittäminen tapahtuu polttamalla näyte puhtaassa hapessa ja korkeassa lämpötilassa (n. 1000 °C), jolloin mahdollisia palokaasuja ovat hiilidioksidi, vesihöyry, typen oksidit, alkuaine typpi ja rikin oksidit. Poltossa syntyneet palokaasut analysoidaan, ja sen perusteella poltetun aineen alkuainepitoisuus saadaan selville. Mitatut alkuainepitoisuudet ilmoitetaan prosenttiosuuksina ja niitä verrataan yhdisteelle laskettuihin teoreettisiin arvoihin.

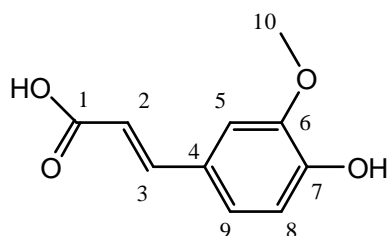
Opinnäytetyön tuotteiden alkuaineanalyysit teki Robertson Microlit Laboratories, Madison, NJ, USA.

#### 4 SYNTEESIT

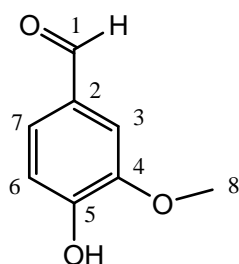
Tavoitteena oli valmistaa betuliinin ja betulonihapon estereitä, joita Kuori-projektissa ei ollut aikaisemmin valmistettu.

Betuliinin reaktioon valittiin lähtöaineeksi ferulihappo ja betulonihapon reaktioihin lähtöaineiksi valittiin vaniliini, kanelialkoholi, karvakroli, tymoli, mentoli,  $\alpha$ -terpinoli ja borneoli (kuva 20).

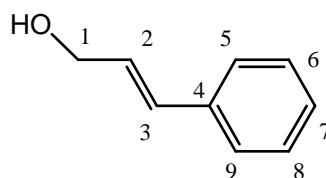
##### ferulihappo



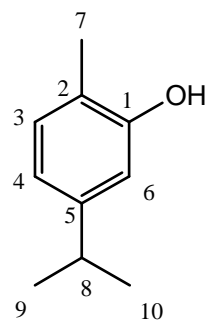
##### vaniliini



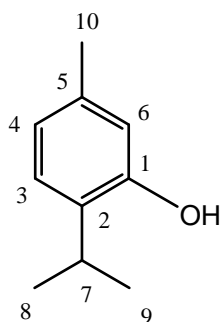
##### kanelialkoholi



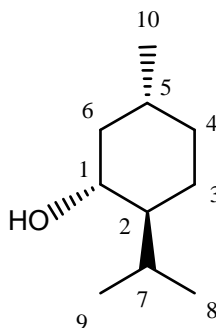
##### karvakroli



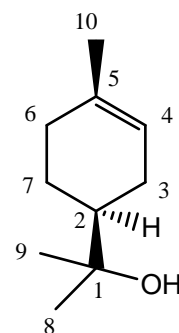
##### tymoli



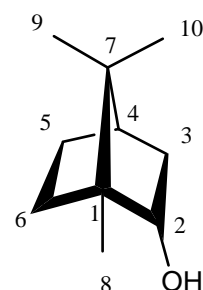
##### (-)-mentoli



##### $\alpha$ -terpinoli



##### (+)-borneoli



Kuva 20. Betuliinin ja betulonihapon esteröintireaktioissa käytetyt lähtöaineet (Huom! Lähtöaineiden numerointi liittyy NMR-spektriin tulkintaan.)

Synteesimenetelmiksi valittiin erilaisia esteröintireaktioita, joiden toimivuudesta eri lähtöaineiden kanssa ei ollut varmuutta ja niitä lähdettiin testaamaan. Reaktioiden toimivuutta seurattiin TLC:n ja NMR:n avulla, raakatuotteet puhdistettiin pylväskromatografisesti ja lopulliset reaktiotuotteet analysoitiin NMR:llä, GC-MS:llä, IR-spektrometrillä ja alkuaineanalyysillä. Lisäksi reaktiotuotteista mitattiin sulamispisteet ja  $R_f$ -arvot.

#### 4.1 Betuliinin uudelleenkiteytys

Työn tavoitteena oli uudelleenkiteyttää 70 %:nen betuliini yli 90 %:seksi. Lisäksi työssä oli muutamia pesu-, uutto- ja kuivausvaiheita, joilla poistettiin betuliinin epäpuhtauksia.

*Taulukko 1. Betuliinin uudelleenkiteytyksessä käytetyt aineet*

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	CAS #
betuliini	442,72	40,5	0,091				473-98-3
(12 %) vesi/2propanoli		1250,0					
THF	72,11			66,0	0,8892	400,0	109-99-9

Hiukan kellertävä betuliini (40,5 g) punnittiin kolviin ja lisättiin 12 % vesi/2-propanoli (1250,0 g). Seosta yritettiin refluksoida 100 °C lämpötilassa, mutta refluksoitumista ei tapahtunut. Lisättiin n. 100,0 g vesi/2-propanolia ja nostettiin lämpötila 120 °C lämpötilaan. Refluksoitui 25 min ja lisättiin n. 100 g vesi/2-propanolia. Refluksointia jatkettiin vielä 30 min, jonka jälkeen seos oli kirkkaan kellertävää. Seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön, jonka jälkeen se siirrettiin jääkaappiin yön yli.

Kolvissa havaittiin muodostuneen runsaasti kellertävää saostumaa. Saostuma suodatettiin Buchner-suppilolla vesi-imussa ja pestiin vedellä (3 X 66 ml). Saostuma liotettiin THF:ään (400 ml) ja lisättiin vettä (500 ml), jolloin vaalea saostuma muodostui runsaasti. Saostuma suodatettiin Bucher-suppilolla vesi-imussa ja pestiin vedellä (3 X 66 ml). Vaaleaa saostumaa oli runsaasti. Saostuma kuivattiin vakuumiuunissa ( $T = 60^\circ$ ,  $p \sim 40$  mbar), jolloin tuotteena saatiin valkoista jauhemaista betuliinia (23,7 g, 0,054 mol, saanto 59,3 %). Karakterisointi on esitetty osioissa 5. (s.40).



## 4.2 Betuliinin hapetus betulonihapoksi

Työ oli kaksivaiheinen. Ensin valmistettiin Jones-reagenssi, jonka jälkeen betuliini hapetettiin betulonihapoksi.

Jonesin-reagenssin valmistuksessa käytettiin natriumdikromaattia, joka on myrkyllinen ja karsinogeeninen aine, joten oikeanlaisesta suojautumisesta ja aineen hävittämisestä oli huolehdittava tarkoin.

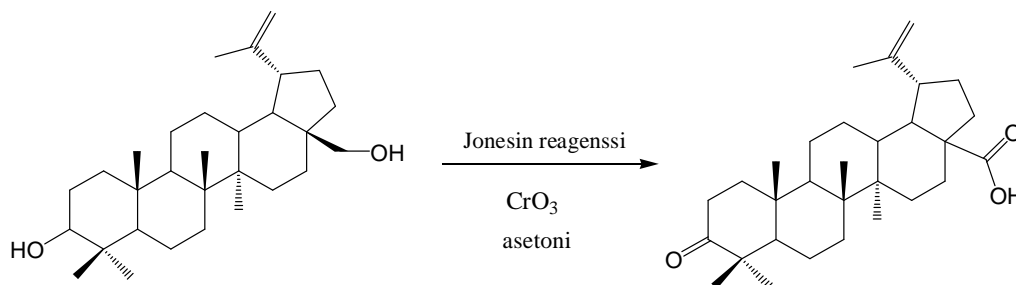
### *Jones-reagenssin valmistus*

*Taulukko 2. Jonesin reagenssin valmistuksessa käytetyt lähtöaineet*

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$	298,00	121,20	0,41				1,0	7789-12-0
$\text{H}_2\text{SO}_4$	98,08	159,50	1,63	337,0	1,80	87,0	4,0	7664-93-9
$\text{H}_2\text{O}$	18,02			100,0		900,0		7732-18-5

Natriumdikromaatti (121,20 g, 0,41 mol) punnittiin erlenmeyeriin ja lisättiin vettä (600 ml). Erlenmeyeriin lisättiin varovasti väkevää rikkihappoa (87 ml) samalla sekoittaen liuosta. Liuos muuttui punaiseksi ja lämpeni hiukan. Vettä lisättiin vielä siten, että kokonaistilavuudeksi tuli 1000 ml. Liuosta sekoitettiin yhteensä 2 tuntia.

### *Betulonihapon valmistus*



*Kuva 21. Betuliinin hapetus betulonihapoksi*

Taulukko 3. Betuliinin hapetuksessa käytetyt lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betuliini	442,72	60,0	0,136				1	473-98-3
Jones-reagenssi	294,20	119,6	0,407			1000	3	
asetoni	58,09			56,1	0,7845	2800		67-64-1
metanoli	32,04			64,6	0,7914	1015		67-56-1
dietyylieetteri	74,12			34,5	0,7138	1200		60-29-7

Betuliini punnittiin kahteen kolviin (30,0 g, 0,68 mol) ja lisättiin magneetit. Kylmää asetonia lisättiin kolveihin (1400 ml). Juuri valmistettua Jones-reagenssia lisättiin tiputussuppilon avulla kolveihin (500 ml) reaktioseoksia samalla sekoittaen. Seoksien annettiin lämmentä huoneenlämpöön, jolloin ne olivat muuttuneet tummanruskeiksi. Sekoitusta jatkettiin yön yli.

Reaktioseokset siirrettiin yhteen erlenmeyeriin ja kolvit huuhdeltiin metanolilla ja lisättiin erlenmeyeriin. Metanolia lisättiin yhteensä 900 ml erlenmeyeriin. Seoksen annettiin seisoa noin puoli tuntia aina välillä sekoittaen. Liuos oli muuttunut vihreäksi. Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin purkkamaista kiinteää vaalean vihreää betulonihappoa. Saostuma siirrettiin kolviin ja lisättiin 1100 ml vettä. Saostuma suodatettiin vesi-imussa Buchner-suppilolla. Saostuma pestiin vielä 600 ml:lla vettä. Saostuma kuivattiin vakuumiuunissa yön yli (  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $p \sim 40\text{ mbar}$ ).

Saostuma punnittiin (70,0 g) ja uutettiin 1050 ml:aan dietyylieetteriä ja pestiin erotussuppilossa 500 ml:lla vettä. Vesifaasi laskettiin pois ja eetterifaasi pestiin 7,5 % HCl/H<sub>2</sub>O-liuoksella (300 ml). Pesuliuos laskettiin pois ja eetterifaasi pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>-liuoksella (300 ml), jolloin vesifaasi muuttui punaisen ruskeaksi. Eetterifaasi pestiin vielä vedellä (300 ml). Eetterifaasi siirrettiin kolviin ja puolet haihdutettiin pois rotavaporilla. Kolviin lisättiin 2,5 M NaOH:ta (76 ml), jolloin vaalean keltaista saostumaa (betulonihapon Na-suola) muodostui runsaasti. Saostuma suodatettiin vesi-imussa Buchner-suppilolla ja pestiin 130 ml:lla Et<sub>2</sub>O:ä. Saostuma kuivattiin vakuumiuunissa yön yli ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $p \sim 40\text{ mbar}$ ).

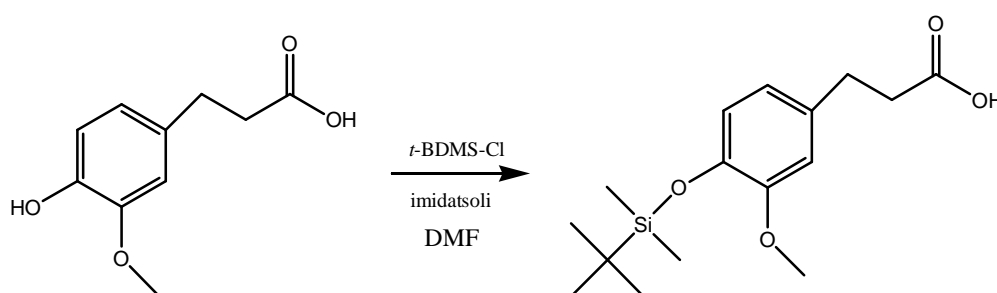
Raakatuote siirrettiin kolviin, johon lisättiin metanolia (50 ml). Seosta refluksottiin 100 °C:n lämpötilassa ja metanolia lisättiin kunnes saostuma oli

liuennut (yhteensä 115 ml). Kuumaan metanoliin lisättiin etikkahappoa (10 ml) ja sekoitusta jatkettiin 10 min. Kolviin lisättiin vettä (150 ml) ja sekoitettiin voimakkaasti, jolloin saostumaa muodostui runsaasti. Saostuma suodatettiin vesi-imussa Buchner-suppilolla ja pestiin 330 ml:lla vettä. Saostuma kuivattiin vakuumiuunissa yön yli ( $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $p \sim 40\text{ mbar}$ ), jolloin tuotteena saatiin vaaleaa jauhemaista betulonihappoa (37,9 g, 0,083 mol, saanto 61,3 %). Karakterisointi on esitetty osioissa 5. (s. 40).

### 4.3 Betuliini-28-ferulihappoesteri

Betuliini-28-ferulihappoesterin synteesi on kolmivaiheinen. Ferulihapon fenolinen hydroksyyli-ryhmä vaatii suojausta, ennen kuin happo voidaan esteröidä betuliinin kanssa. Viimeisessä vaiheessa suojaus poistetaan.

#### *Ferulihapon suojaus*



Kuva 22. Ferulihapon suojaus silaaniryhmällä

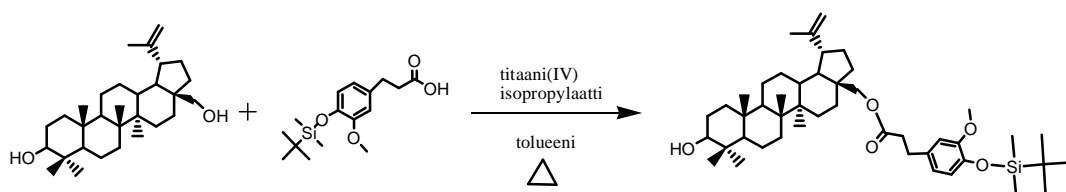
Taulukko 4. Ferulihapon suojauksessa käytetyt lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
ferulihappo	194,19	5,00	25,8				1	1135-24-6
tBDMCISi	150,73	4,66	30,9				1,2	18162-48-6
imidatsoli	68,08	4,38	64,3				2,5	288-32-4
DMF (kuiva)	73,10	75,52		153	0,9440	80,0		68-12-2

Ferulihappo (5,00 g, 25,8 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:ään (80 ml). Seokseen lisättiin imidatsolia (4,38 g, 64,3 mmol) ja *t*-BDMS-Cl (4,66 g, 30,9 mmol). Seosta sekoitettiin 28 h Ar-atmosfäärissä huoneen lämpötilassa. Kolviin lisättiin kylläistä  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -liuosta (50 ml) ja seosta sekoitettiin 6 min. Muodostunut vaaleaa saostuma pestiin vedellä (2 x 50 ml) ja uutettiin

EtOAc:hen (2 x 100 ml). Orgaaninen faasi pestiin vedellä (2 x 50 ml) ja HCl:llä (50 ml, 0,72 %). Liuotin kuivattiin vedettömällä Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla ja haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin saatiin keltaista raakatuotetta. Raakatuote uudelleenkiteytettiin *n*-heksaanin ja EtOAc:n seoksesta (40 ml : 5 ml), jolloin tuotteena saatiin ferulihapon *t*-BDMS-eetteriä. (2,00 g, 6,48 mmol, saanto 21 %).

*Betuliini-28-ferulihappo t-BDMS-eetterin esteri*



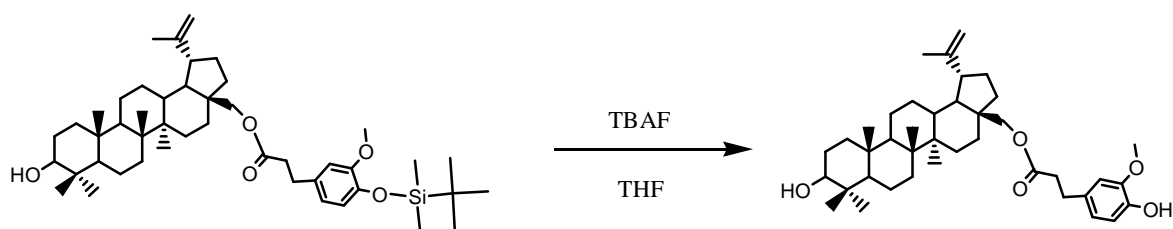
Kuva 23. Betuliinin ja suojatun ferulihapon esteröintireaktio

*Taulukko 5. Synteesin lähtöaineet*

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betuliini	442,72	0,57	1,30				1	473-98-3
ferulihappo (suojattu)	308,45	0,58	1,88				1,45	
titaani(IV)isopropylaatti	284,24	0,11	0,39	218,0	0,9550	0,12	0,3	546-68-9
tolueeni	92,14			110,6	0,8669	120,0		108-88-3

Betuliini (0,57 g, 1,30 mmol) ja ferulihappo *t*-BDMS-eetteri (0,58 g, 1,88 mmol) punnittiin kolviin ja liuotettiin tolueeniin (50 ml). Seokseen lisättiin titaani(IV)isopropylaattia (0,11 g, 0,39 mmol) ja liuosta refluksoitii 140 °C lämpötilassa 9 h. Reaktioseos laimennettiin tolueenilla (70 ml) ja liuos pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>-liuoksella (3 x 40 ml) ja kuivattiin vedettömällä Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla. Liuotin haihdutettiin rotavaporilla ja raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti (h=29,2 cm, d=3,1 cm) silikageelillä (8:1 heksaani:EtOAc), jolloin tuotteena saatiin betuliini-28-ferulihappo *t*-BDMS-eetterin esteriä. (250 mg, 0,34 mmol, saanto 26 %).

### Suojauksen poisto



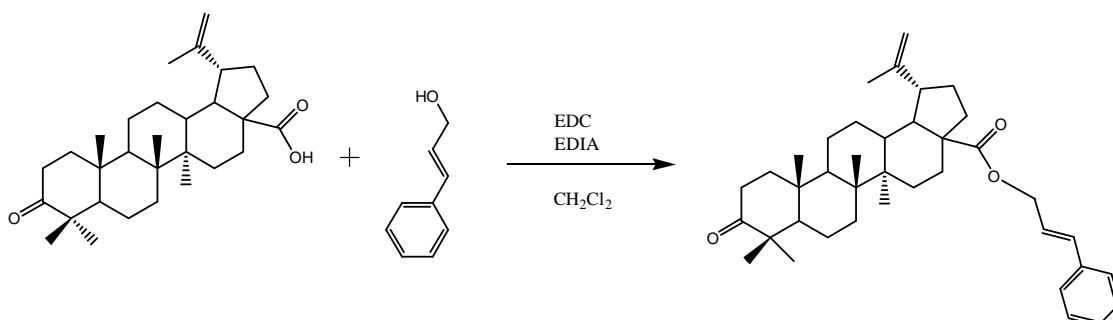
Kuva 24. Silaani-suojaryhmän poisto

Taulukko 6. Suojauksen poistossa käytetyt aineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betuliini-28-ferulihappo (suojattu)	734,53	0,243	0,33				1	
1,0 M TBAF (THF)	261,46		0,66			0,66	2	
THF (kuiva)	72,11			65-67	0,8890	20,0		109-99-9

Betuliini-28-ferulihappo *t*-BDMS-eetterin esterin (240 mg, 0,33 mmol) ja kuivan THF:n (20 ml) seokseen, Ar-atmosfäärissä, lisättiin 1.0 M TBAF THF:ssä (0,66 ml, 0,66 mmol). Liuosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 h. Liuotin haihdutettiin rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin vaalean keltaista betuliini-28-feruliinihappoesteriä. Raakatuote liotettiin CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:een (50 ml), pestiin vedellä (3 x 50 ml), liuotin kuivattiin vedettömällä Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin betuliini-28-ferulihappoesteriä. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti silikageelillä (6:1 ÷ 4:1 heksaani:EtOAc), jolloin tuotteena saatiin vaaleaa kidemäistä betuliini-28-ferulihappoesteriä (60 mg, 0,10 mmol, saanto 7,8 %). Betuliini-28-ferulihappoesterin sulamispiste oli 141 °C ja R<sub>F</sub>-arvo 0,1 (1:8 EtOAc:heksaani). Karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 41).

#### 4.4 Betulonihiippo-28-kanelialkoholiesteri



Kuva 25. Betulonihiippon ja kanelialkoholin esteröinti-reaktio

Taulukko 7. Betulonihiippo-28-kanelialkoholiesterin lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betulonihiippo	454,70	2,00	4,40				1	4481-62-3
kanelialkoholi	134,20	0,59	4,40				1	104-54-1
EDC	191,70	0,93	4,85				1,1	25952-53-8
EDIA	129,25	0,63	4,87				1,1	7087-68-5
dikloorimetaani	34,93			39,8	1,3180	80,0		75-09-2

Betulonihiippo (2,00 g, 4,40 mmol), kanelialkoholi (0,59 g, 4,40 mmol) ja EDC (0,93 g, 4,85 mmol) punnittiin kolviin. Kolviin lisättiin dikloorimetaania (80 ml) ja EDIA:ta (0,63 g, 4,87 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä.

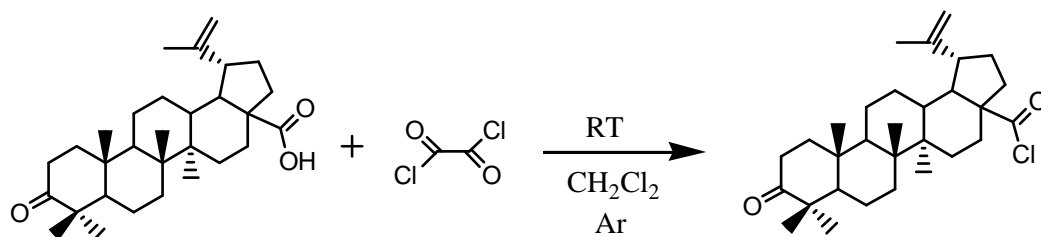
Reaktioseos pestiin 0,2 M sitruunahapolla (2 x 50 ml), vedellä (3 x 50 ml) ja lopuksi lisättiin dikloorimetaania (2 x 40 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ :llä. Dikloorimetaani haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin vaalean kellertävää kidemäistä ainetta. Raakatuote kuivattiin yön yli vakuumiuunissa ( $T = 40\text{ °C}$ ,  $p \sim 40\text{ mbar}$ ).

Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti silikageelillä (4:1 à 1:1 heksaani:EtOAc), jolloin tuotteena saatiin vaaleaa kidemäistä ainetta (60 mg, 0,11 mmol, saanto 2,4 %). Karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 42).

#### 4.5 Betuloni happokloridin esteröintireaktiot

Synteesisarjaa varten valmistettiin yhteensä kolme erää betuloni happokloridia, joiden esteröinneissä käytettiin DMAP-katalyyttiä. Lisäksi yhtenä menetelmänä kokeiltiin betuloni happokloridin esteröintiä in-situ.

##### *Betuloni happokloridin valmistus*



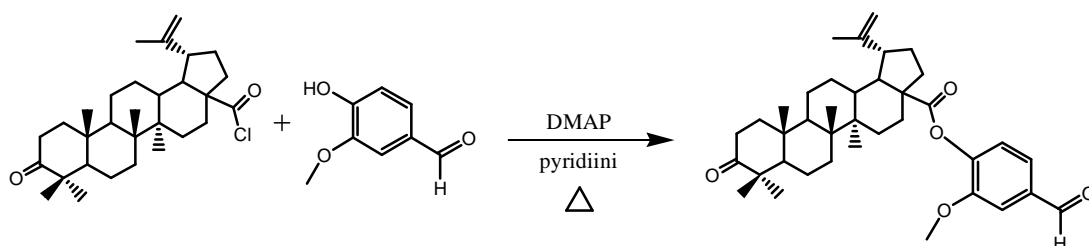
Kuva 26. Betuloni happokloridin valmistus oksalyylikloridilla

Taulukko 8. Betuloni happokloridin valmistuksessa käytetyt lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betuloni happo	454,70	5,00	11,00				1,0	4481-62-3
oksalyylikloridi	126,93	2,96	23,32	63-64	1,4755	2,0	2,1	79-37-8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	34,93			39,8	1,318	120		75-09-2

Betuloni happo punnittiin kolviin (5,00 g, 11,0 mmol) ja lisättiin kuivaa CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:a (120 ml). Kolviin vedettiin Ar-atmosfääri ja lisättiin oksalyylikloridi (2,96 g, 23,3 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä 6 h. Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla. Haihdutusjäännös käsiteltiin kolmella erällä CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:a (yhteensä 90 ml) ja liuotin haihdutettiin pois jokaisella kerralla, jolloin tuotteena saatiin vaalean kellertävää kidemäistä betuloni happokloridia (5,16 g, 10,9 mmol, saanto 99 %).

### Betulonihappon-28-vaniliiniesteri



Kuva 27. Betuloni happokloridin ja vaniliinin esteröintireaktio

Taulukko 9. Betuloni happon-28-vaniliiniesterin lähtöaineet

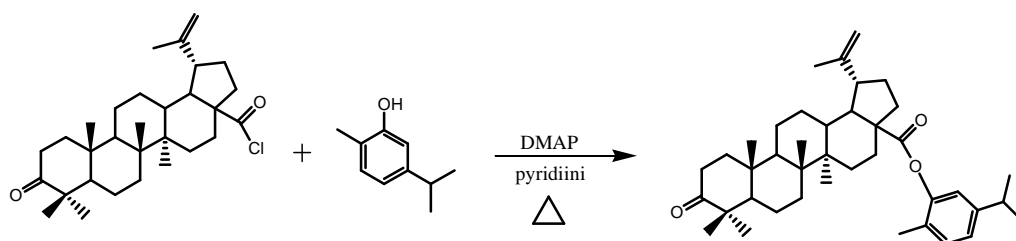
Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betuloni happon- kloridi	473,15	1,50	3,17				1	
vaniliini	152,15	0,48	3,17				1	121-33-5
DMAP	122,17	0,39	3,19				1	1122-58-3
pyridiini (kuiva)	79,10			116,0	0,9830	20,0		110-86-1

Juuri valmistettu betuloni happokloridi (1,50 g, 3,17 mmol), vaniliini (0,48 g, 3,17 mmol) ja DMAP (0,39 g, 3,19 mmol) punnittiin kolviin ja lisättiin kuivaa pyridiiniä (20 ml). Kolviin vedettiin Ar-atmosfääri ja reaktioseosta sekoitettiin 40 °C lämpötilassa 21 h.

Reaktiovaiheessa syntynyt saostuma, joka sisälsi epäpuhtauksia, suodatettiin ja pestiin pyridiinillä (5 ml). Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin saatiin raakatuotteena tummaa viskoosia ainetta. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti (h=32,0 cm, d=3,0 cm) silikageelillä (9:1 à 6:1 heksaani:EtOAc), jolloin tuotteena saatiin valkoista kidemäistä ainetta (0,37 g, 0,63 mmol, 20 %). Tuotteen sulamisväli oli 134 - 135 °C ja  $R_f$ -arvo 0,3 (1:6 EtOAc:heksaani). Tuotteen karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 43).



### Betulonihappo-28-karvakroliesteri



Kuva 28. Betulonihappokloridin ja karvakrolin esteröintireaktio

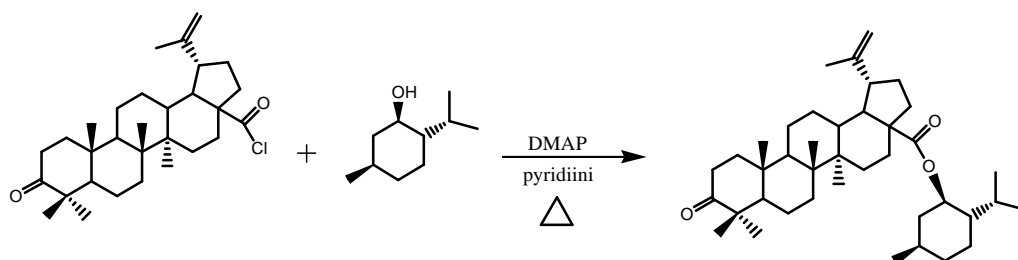
Taulukko 10. Betulonihappo-28-karvakroliesterin lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betulonihappokloridi	473,15	1,50	3,17				1	
karvakroli	150,22	0,48	3,18		0,9760	0,49	1	499-75-2
DMAP	122,17	0,39	3,19				1	1122-58-3
pyridiini (kuiva)	79,10			116,0	0,9830	20,0		110-86-1

Juuri valmistettu betulonihappokloridi (1,50 g, 3,17 mmol), karvakroli (0,48 g, 3,18 mmol) ja DMAP (0,39 g, 3,19 mmol) punnittiin kolviin ja lisättiin kuivaa pyridiiniä (20,0 ml). Kolviin vedettiin Ar-atmosfääri ja reaktioseosta sekoitettiin 40 °C lämpötilassa 42 h.

Reaktiovaiheessa syntynyt saostuma, joka sisälsi epäpuhtauksia, suodatettiin ja pestiin pyridiinillä (5 ml). Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin tummaa viskoosia ainetta. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti kaksi kertaa ( $h = 37,6$  cm,  $d = 2,3$  cm) silikageelillä (15:1 ÷ 11:1 tolueeni:EtOAc), jolloin raakatuotteena saatiin kellertävää viskoosia ainetta. Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla ja raakatuote uudelleenkiteytettiin kolmesti, ensin *n*-heksaanista (5 ml), jonka jälkeen kahdesti 2-propanolin ja veden seoksesta (5 ml : 2 ml), jolloin tuotteena saatiin valkoista kidemäistä ainetta (0,24 g, 0,41 mmol, saanto 13 %). Tuotteen sulamiskäyvä oli 128 – 129 °C ja  $R_f$ -arvo 0,7 (1 : 8 EtOAc :heksaani). Tuotteen karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 45).

### Betulonihappo-28-mentoliesteri



Kuva 29. Betulonihappokloridin ja mentolin esteröintireaktio

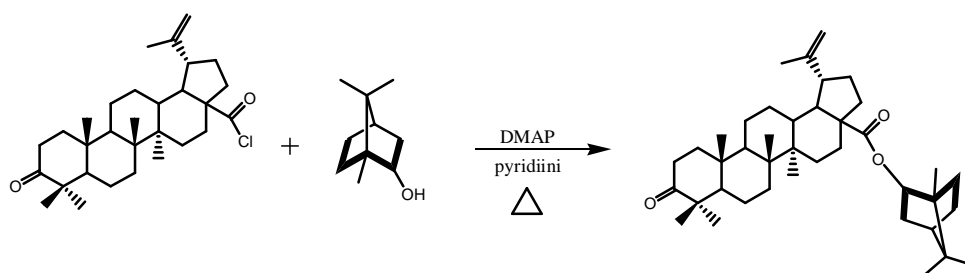
Taulukko 11. Betulonihappo-28-mentoliesterin lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betulonihappokloridi	473,15	1,50	3,17				1	
mentoli	156,27	0,50	3,2				1	89-78-1
DMAP	122,17	0,39	3,19				1	1122-58-3
pyridiini (kuiva)	79,10			116,0	0,9830	20,0		110-86-1

Reaktio tehtiin ohjeen *betulonihappo-28-vaniliiniesteri* mukaan. (s. 34).

Reaktiovaiheessa syntynyt saostuma, joka sisälsi epäpuhtauksia, suodatettiin ja pestiin pyridiinillä (5 ml). Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin tummaa viskoosia ainetta. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti ( $h = 27,6$  cm,  $d = 3,2$  cm) silikageelillä (9:1 tolueeni:EtOAc), jolloin raakatuotteena saatiin vaalean keltaista betulonihappo-28-mentoliesteriä. Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla ja raakatuote uudelleenkiteytettiin *n*-heksaanista (5 ml), jolloin tuotteena saatiin vaalean kellertävää kidemäistä ainetta (0,66 g, 1,11 mmol, saanto 35 %). Tuotteen sulamispiste oli 194 °C ja  $R_f$ -arvo 0,8 (1:6 EtOAc:heksaani). Tuotteen karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 46).

### Betulonihappo-28-borneoliesteri



Kuva 30. Betulonihappokloridin ja borneolin esteröintireaktio

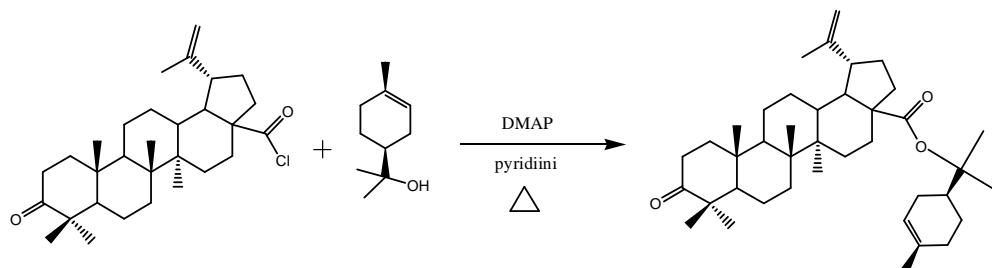
Taulukko 12. Betulonihappo-28-borneoliesterin lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betulonihappokloridi	473,15	1,50	3,17				1	
borneoli	154,25	0,49	3,18		1,0110		1	507-70-0
DMAP	122,17	0,39	3,19				1	1122-58-3
pyridiini (kuiva)	79,10			116,0	0,9830	20,0		110-86-1

Reaktio tehtiin ohjeen *betulonihappo-28-vaniliiniesteri* mukaan. (s. 34).

Reaktiovaiheessa syntynyt saostuma, joka sisälsi epäpuhtauksia, suodatettiin ja pestiin pyridiinillä (5 ml). Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin tummaa viskoosia ainetta. Raakatuote puhdistettiin flash-kromatografisesti ( $h = 35,3$  cm,  $d = 3,2$  cm) silikageelillä (8:1 tolueeni:EtOAc), jolloin raakatuotteena saatiin vaaleaa viskoosia ainetta. Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla ja raakatuote uudelleenkiteytettiin kolmesti, ensin *n*-heksaanin ja EtOAc:n seoksesta (15 ml: 1 ml), *n*-heksaanista (5 ml) ja viimeiseksi 2-propanolin ja veden seoksesta (11 ml: 2 ml), jolloin tuotteena saatiin vaalean kellertävää kidemäistä ainetta (0,50 g, 0,85 mmol, saanto 27 %). Tuotteen sulamispiste oli 242 °C ja  $R_f$ -arvo 0,8 (1:6 EtOAc:heksaani). Tuotteen karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 47).

*Betuloni happo-28-( $\alpha$ )-terpinoliesteri*



*Kuva 31. Betuloni happokloridin ja  $\alpha$ -terpinolin esteröintireaktio*

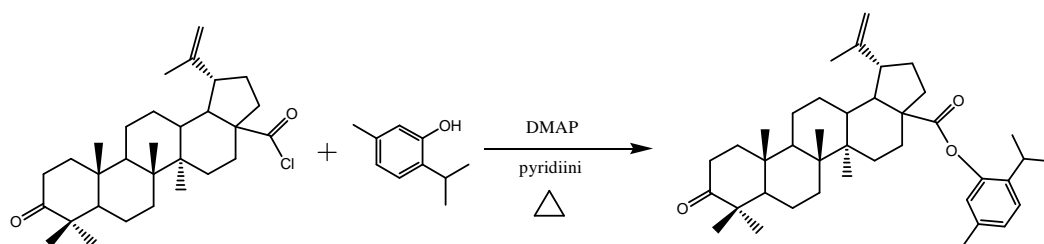
*Taulukko 13. Betuloni happo-28-( $\alpha$ )-terpinoliesterin lähtöaineet*

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betuloni happo-kloridi	473,15	1,50	3,17				1	
$\alpha$ -terpinoli	154,25	0,49	3,18		1,0110		1	10482-56-1
DMAP	122,17	0,39	3,19				1	1122-58-3
pyridiini (kuiva)	79,10			116,0	0,9830	20,0		110-86-1

Reaktio tehtiin ohjeen *betuloni happo-28-vaniliiniesteri* mukaan. (s. 34).

Reaktiovaiheessa syntynyt saostuma, joka sisälsi epäpuhtauksia, suodatettiin ja pestiin pyridiinillä (2 x 5 ml). Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin tumman ruskeaa viskoosia ainetta 2,39 g. Reaktion tuloksia on arvioitu osiossa 5. (s. 48).

### Betuloni happo-28-tymoliesteri



Kuva 32. Betuloni happokloridin ja tymolin esteröintireaktio

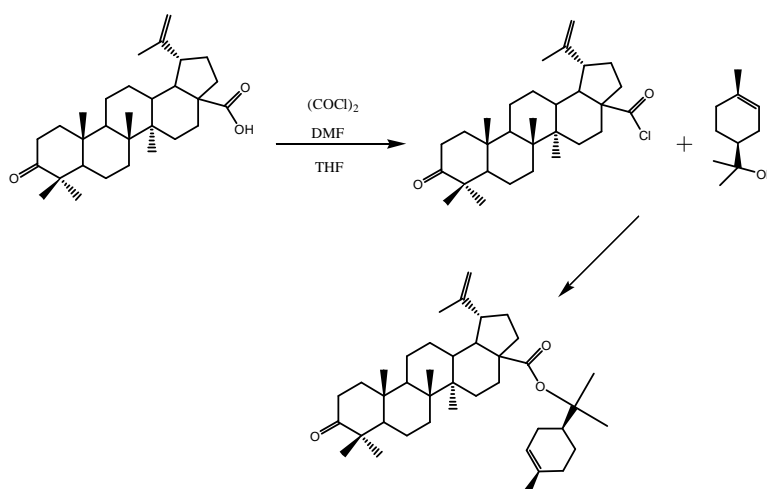
Taulukko 14. Betuloni happo-28-tymoliesterin lähtöaineet

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
Betuloni happo-kloridi	473,15	1,50	3,17				1	
tymoli	150,22	0,48	3,2				1	89-83-8
DMAP	122,17	0,39	3,19				1	1122-58-3
pyridiini (kuiva)	79,10			116,0	0,9830	20,0		110-86-1

Reaktio tehtiin ohjeen *betuloni happo-28-vaniliiniesteri* mukaan. (s. 34).

Reaktiovaiheessa syntynyt saostuma, joka sisälsi epäpuhtauksia, suodatettiin ja pestiin pyridiinillä (2 x 5 ml). Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin ruskeaa viskoosia ainetta 2,37 g. Reaktion tuloksia on arvioitu osiossa 5. (s. 48).

*Betulonihappon 28-( $\alpha$ )-terpinoliesteri in-situ-reaktiolla*



*Kuva 33. Betulonihappon ja  $\alpha$ -terpinolin esteröinti in-situ-reaktiolla*

*Taulukko 15. Betulonihappon 28- $\alpha$ -terpinoliesterin lähtöaineet*

Aineet	M (g/mol)	m (g)	n (mmol)	kp (°C)	tiheys (kg/l)	V (ml)	ekv	CAS #
betulonihappon	454,70	1,50	3,28				1,0	4481-62-3
oksalyylikloridi	126,93	0,50	3,94	63-64	1,4755	0,34	1,2	79-37-8
$\alpha$ -terpinoli	154,25	0,51	3,28				1,0	10482-56-1
THF (kuiva)	72,11			65-67	0,8890	40		109-99-9
DMF (kuiva)	73,10				0,9440	5 tippaa		68-12-2

Betulonihappon (1,50 g) liuotettiin tetrahydrofuraaniin (20 ml) ja kolviin vedettiin Ar-atmosfääri. Kolviin lisättiin septumin kautta oksalyylikloridi (0,34 ml) ja dimetyyliformamidi (5 tippaa). Reaktioseosta sekoitettiin 2 h. THF:ään (20 ml) liuotettu  $\alpha$ -terpinoli (0,51 g) lisättiin kolviin tipoitain septumin kautta 10 min aikana. Reaktioseoksen sekoittamista jatkettiin yön yli. Liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin raakatuotteena saatiin kellertävää viskoosia ainetta, joka liuotettiin EtOAc:hen (80 ml). Orgaaninen faasi pestiin  $\text{NaHCO}_3$ :lla (2 x 50 ml), 1,0 M HCl:llä (50 ml) ja vedellä (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ :lla ja liuotin haihdutettiin pois rotavaporilla, jolloin tuotteena saatiin keltaista viskoosia saistumaa 1,83 g. Saostumaa kuivattiin vakuumiuunissa ( $T = 40\text{ °C}$ ,  $p \sim 40\text{ mbar}$ ) kaksi vuorokautta, jolloin tuotteena saatiin keltaista saostumaa (1,39 g, 2,35 mmol, saanto 71,6 %). Tuotteen karakterisointi on esitetty osiossa 5. (s. 49).

## 5 TUOTTEIDEN KARAKTERISOINTI JA TULOKSET

### 5.1 Betuliinin uudelleenkiteytys

Betuliini puhdistettiin uudelleenkiteyttämällä. Liuottimena uudelleenkiteytyksessä käytettiin 12 %:sta vesi/2-propanolia ja puhdistuksen jälkeen tuotteena saatiin valkoista kidemäistä ainetta 23,7 g, 0,054 mol eli 59,3 % teoreettisesta saannosta. Tuoteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 1) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 2). Spektreistä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,76 (s, 3H), 0,82 (s, 3H), 0,97 (s, 3H), 1,02 (s, 3H), 1,39 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 2,39 (m, 1H), 3,18 (dd,  $J = 9,9, 5,7$  Hz, 1H), 3,33 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H), 3,80 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H), 4,58 (s, 1H), 4,68 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,7, 15,3, 15,9, 16,0, 16,1, 18,3, 19,1, 20,8, 25,2, 27,0, 27,4, 28,0, 29,1, 29,7, 33,9, 34,2, 37,1, 37,3, 38,7, 38,9, 40,9, 42,7, 47,8, 48,7, 50,4, 55,3, 60,5, 79,0, 109,7, 150,1

$^{13}\text{C}$ NMR-spektristä löydettiin betuliinin kaikkien 30 hiiliatomin signaalit ja  $^1\text{H}$ NMR-spektristä löydettiin betuliinirungon metyyliiryhmien vetysignaalit sekä hiilien  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_{19}$ ,  $\text{C}_{28}$  ja  $\text{C}_{29}$  vetyatomien signaalit. Tuote todettiin olevan betuliinia ja puhtauden olevan  $^1\text{H}$ NMR-spektrin perusteella noin 95 %.

### 5.2 Betuliinin hapetus betulonihapoksi

Betulonihappoa valmistettiin hapettamalla betuliinia Jonesin reagenssilla. Reaktion ja monien puhdistusvaiheiden jälkeen tuotteena saatiin vaaleaa kidemäistä ainetta 37,9 g, 0,083 mol eli 61,3 % teoreettisesta saannosta. Tuoteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR-spektri (liite 3). Spektristä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,92 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,43 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 2,44 (m, 1H), 3,00 (dt,  $J = 10,7, 6,3$  Hz, 1H), 4,61 (s, 1H), 4,74 (s, 1H)

Spektrin perusteella tuotteen voitiin todeta olevan betulonihappoa. Epäpuhtauksina tuotteessa arvioitiin olevan puhdistusvaiheista jääneitä liuottimia, joskaan niitä ei ollut kovin paljon. Saanto oli kohtuullisen hyvä verrattuna kirjallisuudessa ilmoitettuun saantoon.

### 5.3 Betuliini-28-ferulihappoesteri

Synteesi oli monivaiheinen, sillä ferulihappo täytyi ensin suojata, ennen kuin se esteröitiin betuliinin kanssa. Esteröinnin jälkeen suojaus poistettiin ja tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiovaiheiden ja puhdistuksen jälkeen tuotteena saatiin vaaleaa kidemäistä ainetta 60 mg, 0,10 mmol eli 7,8 % teoreettisesta saannosta. Tuoteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 4) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 5). Spektreistä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,75 (s, 3H), 0,82 (s, 3H), 0,96 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 2,47 (m, 1H), 3,17 (dd,  $J = 10,7, 4,8$  Hz, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,97 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H), 4,38 (d,  $J = 11,1$  Hz, 1H), 4,59 (s, 1H), 4,70 (s, 1H) 6,29 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H), 6,90 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,02 (s, 1H), 7,06 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,60 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,7, 15,3, 16,0, 16,0, 18,2, 19,1, 20,7, 25,1, 27,0, 27,3, 27,9, 29,6, 29,8, 34,1, 34,6, 37,1, 37,5, 38,6, 38,8, 40,8, 42,6, 46,5, 47,6, 48,8, 50,3, 55,2, 55,9, 62,6, 78,9, 109,3, 109,8, 114,8, 115,4, 123,0, 126,9, 144,7, 146,8, 148,0, 150,1, 167,8

$^{13}\text{C}$ NMR-spektrin mukaan reaktio oli selvästi tapahtunut, sillä esterin  $\text{C}=\text{O}$ -signaali havaittiin kemiallisen siirtymän kohdassa 167,8 ppm ja betuliinin  $\text{C}_{28}$  signaali oli siirtynyt kohdasta 60,5 ppm kohtaan 62,6 ppm. Spektristä havaittiin myös ferulihapon tunnusomaiset kaksoissidoksen hiilien sekä aromaattisten hiilien signaalit. Lisäksi spektristä havaittiin kaikkien 40 hiiliatomin signaalit, joka viittasi tuotteen olevan betuliini-28-ferulihappoesteriä.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä löydettiin kaikki betuliinirungolle tunnusomaiset metyyliryhmien vetysignaalit, ferulihapon  $\text{C}=\text{C}$ -sidoksen vetyatomien signaalit kemiallisen siirtymän kohdissa 6,29 ppm ja 7,60 ppm sekä aromaattisten hiilien vetysignaalit. Spektrien perusteella molempien lähtöaineiden rakenteet olivat säilyneet ja esteröityminen oli selvästi tapahtunut ja näin ollen tuotteen todettiin olevan betuliini-28-ferulihappoesteriä.

Tuotteen IR-spektristä (liite 6) havaittiin signaalit aaltoluviilla  $1032\text{ cm}^{-1}$  (C-O venytys),  $1156\text{ cm}^{-1}$  (C-O venytys),  $1267\text{ cm}^{-1}$  (C-O venytys),  $1515\text{ cm}^{-1}$  (C=C venytys),  $1705\text{ cm}^{-1}$  (C=O venytys),  $2942\text{ cm}^{-1}$  (C-H venytys),  $3536\text{ cm}^{-1}$  (O-H venytys).



Alkuaineanalyysin mukaan tuotteessa oli 74,64 % hiiltä, 8,95 % vetyä ja 16,41 % happea. Poikkeamat betuliini-28-ferulihappoesterin laskennallisiin arvoihin olivat yli 0,4 %, mutta tulokset pysyivät kuitenkin normaalien rajojen sisällä ja näin ollen tulos oli kohtuullisen hyvä.

Tuotteena saatiin sitä, mitä haluttiin, mutta saanto ei ollut hyvä. Pienen saannon syitä arvioitiin olevan monivaiheinen reaktio, useat puhdistusvaiheet sekä se, että yhdessä työvaiheessa ei yhdistetty orgaanisia faaseja, jolloin saanto olisi huomattavasti parantunut. Tuotteen puhtauden todettiin olevan  $^1\text{H}$ NMR-spektrin perusteella noin 93 %.

#### 5.4 Betulonihiappo-28-kanelialkoholiesteri

KytKentäreagenssina synteesissä käytettiin EDC:tä. Reaktiovaiheen ja puhdistusten jälkeen tuotteena saatiin valkoista kideäistä ainetta 60 mg, 0,11 mmol eli 2,4 % teoreettisesta saannosta. Tuotteesta mitattiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 7) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 8).

Tarkasteltaessa  $^{13}\text{C}$ NMR-spektriä havaittiin, että betulonihiapon karboksyylihiapon C=O-signaali oli pysynyt n. 180 ppm tuntumassa, mutta esterin C=O-signaalia ei havaittu. Esteröitymistä ei siis ollut tapahtunut. Spektristä havaittiin kuitenkin betulonihiapon ketoryhmän signaali kohdassa 218,0 ppm ja kanelialkoholin aromaattisten hiilien signaalit sekä hiiliketjun kaksoissidoksen hiilien signaalit kohdissa 156,0 ppm ja 136,5 ppm. Kanelialkoholin C<sub>1</sub>-signaalin paikka ei ollut myöskään muuttunut, joka viittasi siihen, että reaktio ei ollut tapahtunut. Spektristä laskettiin hiiliatomien lukumääräksi 41, kun betulonihiappo-28-kanelialkoholiesterin hiiliatomien lukumäärän pitäisi olla 39.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä havaittiin betuliinirungon tunnusomaiset signaalit, kanelialkoholin aromaattisten hiilien vetysignaalit sekä kaksoissidoksen vetyatomien signaalit. Kanelialkoholin C<sub>1</sub> vetyatomien signaalia ei löydetty spektristä, sillä betulonihiapon C<sub>29</sub> vetyatomien signaalit peittivät kyseisen alueen. Tuotteessa todettiin olevan myös paljon liuottimien aiheuttamia signaaleja. Spektrien perusteella reaktiota ei ollut tapahtunut, sillä hiilispektrissä ei havaittu esterin C=O-signaalia ja kanelialkoholin C<sub>1</sub> signaalin paikka ei ollut muuttunut.

Spektrien tulkinnan perusteella toivottua betulonihiapon ja kanelialkoholin reaktiota ei tapahtunut kyseisellä menetelmällä. Molempien lähtöaineiden rungot olivat kuitenkin pääosin havaittavissa spektristä. Johtopäätöksenä oli,

että esteröintireaktiossa käytetty EDC, ei ollut riittävän tehokas kytkentäreagenssi.

## 5.5 Betulonihiappokloridi ja esteröintireaktiot

Synteesisarjassa valmistettiin yhteensä kolme erää betulonihiappokloridia. Reaktiovaiheen ja puhdistuksen jälkeen tuotteena saatiin kellertävää kidemäistä ainetta noin 5,20 g, 11,00 mmol eli noin 100 % teoreettisesta saannosta. Tuotetta ei varmistettu millään analyysimenetelmällä vaan luotettiin siihen, että reaktio oli tapahtunut.

Happokloridit ovat erittäin reaktiivisia, mutta synteesisarjan aikana todettiin, että itse valmistetun betulonihiappokloridin reaktiivisuus ei säilynyt kovinkaan kauan, vaikka tuotetta säilöttiin jääkaapissa suojakaasun (Ar) alla. Havainto perustui yhdestä betulonihiappokloridierästä tehtyihin synteeseihin, joista ensimmäinen tehtiin juuri valmistetusta happokloridista, jolloin se esteröi alkoholin. Kahdessa muussa synteesissä, jotka tehtiin 4 - 7 päivän kuluttua happokloridin valmistuksesta, esteröitymistä ei ollut tapahtunut.

Johtopäätöksenä oli, että valmistettu yhdiste oli betulonihiappokloridi ja saanto jokaisessa erässä oli odotetun kaltainen (n. 100%), mutta happokloridi tulisi käyttää mahdollisimman nopeasti valmistuksen jälkeen, mieluiten välittömästi, jotta sen reaktiivisuus säilyisi ja esteröintireaktiot onnistuisivat.

### *Betulonihiappo-28-vanilliiniesteri*

Esteröinti tehtiin juuri valmistetun betulonihiappokloridin avulla ja katalyyttinä reaktiossa oli DMAP. Reaktiovaiheen ja puhdistusten jälkeen tuotteena saatiin valkoista kidemäistä ainetta 0,37 g, 0,63 mmol eli 20 % teoreettisesta saannosta. Tuoteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 9) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 10). Spektreistä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,93 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,26 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 1,71 (s, 3H), 3,03 (dt,  $J = 11,1, 4,8$  Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 4,62 (s, 1H), 4,73 (s, 1H), 7,14 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,49 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,50 (s, 1H), 9,96 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,6, 15,9, 15,9, 19,3, 19,6, 21,0, 21,4, 25,5, 26,6, 29,6, 30,4, 31,9, 33,7, 34,1, 36,9, 37,0, 38,3, 39,6, 40,7, 42,5, 46,7, 47,3, 49,3, 49,9, 54,9, 55,9, 57,1, 109,8, 110,7, 123,5, 124,8, 135,1, 145,2, 150,2, 152,3, 173,4, 191,1, 218,1

Esteröityminen oli selvästi onnistunut, sillä  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrissä havaittiin betulonihapon karboksyylihapon  $\text{C}=\text{O}$ -signaalin siirtyneen 182,0 ppm:stä 173,4 ppm:ään. Spektristä havaittiin myös betulonihapon ketoryhmän signaali kohdassa 218,1 ppm sekä vaniliinin aldehydin signaali kohdassa 191,1 ppm. Lisäksi spektristä voitiin tunnistaa vaniliinin aromattisten hiilien signaalit.  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrissä todettiin olevan hiiliatomeja yhteensä 38, joka viittasi tuotteen olevan betulonihapon-28-vaniliiniesteriä.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä tunnistettiin betuliinirungon metyyliryhmien vetysignaalit sekä muut sille tunnusomaiset singaalit. Vaniliinin metyyliryhmän vetysignaali havaittiin kohdassa 3,89 ppm ja aldehydin vetysignaali kohdassa 9,96 ppm. Lisäksi spektristä löydettiin vaniliinin aromaattisten hiilien vetysignaalit. Spektrien perusteella tuotteen todettiin olevan betuliini-28-vaniliiniesteriä.

Tuotteen IR-spektristä (liite 11) havaittiin signaalit aaltoluvuilla  $1076\text{ cm}^{-1}$  (C-O venytys),  $1274\text{ cm}^{-1}$  (C-O venytys),  $1642\text{ cm}^{-1}$  (aldehydi  $\text{C}=\text{O}$  venytys),  $1702\text{ cm}^{-1}$  (ketoni  $\text{C}=\text{O}$  venytys),  $1756\text{ cm}^{-1}$  (esteri  $\text{C}=\text{O}$  venytys),  $2730\text{ cm}^{-1}$  (C-H venytys),  $2869\text{ cm}^{-1}$  (C-H venytys) ja  $2949\text{ cm}^{-1}$  (C-H venytys). Tärkeimmät funktionaaliset ryhmät voitiin tunnistaa spektristä.

Alkuaineanalyysin mukaan tuotteessa oli 77,60 % hiiltä, 9,04 % vetyä ja 13,36 % happea ja poikkeamat betulonihappo-28-vaniliiniesterin laskennallisiin arvoihin olivat alle 0,4 % ja näin ollen tulos oli erittäin hyvä. Alkuaineanalyysi vahvisti tuotteen olevan betulonihappo-28-vaniliiniesteriä.

Kokonaissaannon odotettiin olevan hyvä, sillä reaktiossa käytettiin hyvin reagoivaa happokloridia ja katalyyttinä käytettiin DMAP:tä. Saanto oli kuitenkin vain 20 % teoreettisesta saannosta. Tähän on voinut vaikuttaa pitkä reaktioaika, jolloin sivutuotteiden määrä voi kasvaa, pylväs-kromatografinen puhdistus sekä se, että vaniliinin hydroksyyli ryhmä on steerisesti estynyt. Myöskään täyttä varmuutta itse valmistetun betulonihappokloridin puhtaudesta ja reaktiivisuudesta ei ollut. Tuote oli kuitenkin toivottua ja  $^1\text{H}$ NMR-spektrin perusteella puhtaus oli kohtuullisen hyvä, noin 93 %.

### *Betulonihappo-28-karvakroliesteri*

Esteröinti tehtiin juuri valmistetun happokloridin avulla ja katalyyttinä reaktiossa oli DMAP. Reaktiovaiheen ja useiden puhdistusvaiheiden jälkeen saatiin tuotteena valkoista kideäistä ainetta 0,24 g, 0,41 mmol eli 13 % teoreettisesta saannosta. Tuoteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 12) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 13). Spektreistä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,93 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,08 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,25 (s, 3H), 1,47 (s, 3H), 1,71 (s, 3H), 2,16 (s, 3H), 2,88 (m, 1H), 3,09 (td,  $J = 10,8, 4,8$  Hz, 1H), 4,62 (s, 1H), 4,74 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 7,00 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,15 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,7, 15,9, 15,9, 16,0, 19,4, 19,6, 21,0, 21,5, 23,9, 24,0, 25,6, 26,6, 29,8, 30,6, 32,1, 33,5, 33,7, 34,1, 36,9, 37,1, 38,4, 39,7, 40,8, 42,6, 46,8, 47,3, 49,4, 50,0, 55,0, 56,9, 109,8, 119,7, 123,8, 127,3, 130,9, 148,0, 149,2, 150,3, 174,3, 218,2

$^{13}\text{C}$ NMR-spektristä todettiin esteröitymisen tapahtuneen, koska betulonihapon karboksyylihapon C=O-signaali oli siirtynyt 182,0 ppm:stä 174,3 ppm:ään. Spektristä havaittiin myös betulonihapon ketoryhmän signaali kohdassa 218,2 ppm sekä karvakrolin aromattisten hiilien signaalit.  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrin mukaan hiiliatomien lukumääräksi saatiin 40, joka viittasi tuotteen olevan betulonihappo-28-karvakroliesteriä.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä havaittiin kaikki betuliinirungon metyyliryhmien vetysignaalit ja muut tunnusomaiset signaalit sekä karvakrolin kolmen metyyliryhmän vetysignaalit kemiallisen siirtymän kohdista 1,22 ppm, 1,25 ppm ja 2,16. Lisäksi spektristä havaittiin karvakrolin aromaattisten hiilien vetysignaalit. Spektrien tarkastelun perusteella tuotteen todettiin olevan betulonihappo-28-karvakroliesteriä.

MS-ajo tehtiin suorasyöttömenetelmällä ja tarkoituksena oli tutkia löytyykö spektristä (liite 14) oletettua betulonihappo-28-karvakroliesterin molekyyliä m/z-arvolla 586. Molekyyliä löydettiin m/z-arvolla 586, joka varmisti tuotteen olevan betulonihappo-28-karvakroliesteriä.

Saanto ei ollut kovin hyvä (13 %), johon saattoi vaikuttaa pitkä reaktioaika ja se, että karvakrolin fenolinen hydroksyyli ryhmä on steerisesti estynyt sekä itse valmistetun betulonihappokloridin epäpuhtaus. Vaikuttavimpina tekijöinä saantoon olivat kuitenkin useat pylväkromatografiset puhdistukset sekä

uudelleen kiteyttämiset, jotka auttamatta söivät kokonaissaantoa. Synteesin tavoite saatiin kuitenkin täytettyä ja betulonihappo-28-karvakroliesterin puhtauden arvioitiin olevan  $^1\text{H}$ NMR-spektrin perusteella noin 93 %.

#### *Betulonihappo-28-mentoliesteri*

Esteröinti tehtiin juuri valmistetun happokloridin avulla ja katalyyttinä reaktiossa oli DMAP.. Reaktiovaiheen ja puhdistusten jälkeen tuotteena saatiin kellertävää kidemäistä ainetta 0,66 g, 1,11 mmol eli 35 % teoreettisesta saannosta. Tuotteesta mitattiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 15) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 16). Spektreistä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,82 (s, 3H), 0,84 (d, 3H), 0,86 (d, 3H) 0,92 (s, 3H), 0,98 (s, 3H), 1,00 (s, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,05 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,89 (m, 1H), 3,00 (td,  $J = 10,5, 3,9$  Hz, 1H), 4,61 (s, 1H), 4,72 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,5, 15,8, 15,9, 19,4, 19,6, 21,0, 21,0, 21,3, 25,2, 25,5, 26,5, 26,7, 29,7, 30,1, 30,3, 31,5, 31,6, 33,6, 34,0, 34,1, 35,9, 36,8, 36,9, 38,2, 39,6, 40,7, 42,5, 43,5, 46,5, 47,3, 49,1, 49,9, 49,9, 55,0, 58,0, 61,3, 109,9, 149,8, 171,9, 218,0

$^{13}\text{C}$ NMR-spektriä tarkasteltaessa todettiin esteröitymisen tapahtuneen, sillä betulonihapon karboksyylihapon C=O-signaalin paikka oli siirtynyt 182,0 ppm:stä 171,9 ppm:ään. Spektristä havaittiin myös betulonihapon ketoryhmän signaali kohdassa 218,0 ppm. Spektrin perusteella hiiliatomien lukumääräksi saatiin 40, mutta mentolin  $\text{C}_1$ , johon hydroksyyli ryhmä on kiinnittynyt, signaalin paikka ei ollut muuttunut. Muut mentolin hiilien signaalit olivat oikeilla paikoillaan.  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrin perusteella ei voitu olla kovinkaan varmoja oikean reaktion tapahtumisesta, vaikka esteröitymistä oli tapahtunutkin.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä havaittiin kaikki betuulinirungolle ominaiset signaalit sekä mentolin kolmen metyyli ryhmän vetysignaalit kemiallisen siirtymän kohdissa 0,82 ppm, 0,84 ja 0,92 ppm, joskin niiden integraalit olivat huomattavan pienet. Spektristä havaittiin lisäksi mentolin sykloheksaanirungosta selvästi kaikkien muiden vetyjen signaalit paitsi  $\text{C}_1$ -vedyn signaalia.  $\text{C}_1$ -vety antoi signaalin kemiallisen siirtymän kohtaan 4,81 ppm, mutta piikin integraali oli todella pieni. Spektrien perusteella voitiin todeta, että toivottua betuliini-28-mentoliesteriä ei saatu valmistetuksi, tosin sitä saattoi olla hyvin vähän tuotteessa. Tuotteena saatua esterä ei voitu kuitenkaan tarkasti identifioida.

Lähtöaineena käytettiin tuoretta betulonihappokloridia ja oletettiin, että synteesi onnistuisi kuten aiemmin. Tuotteena saatu esteri ei kuitenkaan ollut haluttua betulonihappo-28-mentoliesteriä, vaan jokin muu esteri. Tarkalleen ei voida sanoa, miksi reaktio ei toiminut. Ainoa ero kahteen aikaisemmin onnistuneeseen synteesiin oli se, että toisena lähtöaineena oli syklinen alifaattinen alkoholi, kun taas onnistuneissa betulonihappokloridin synteeiseissä lähtöaineina olivat fenolit. Lisäksi ero esimerkiksi mentolin ja karvakrolin välillä on se, että mentolissa hydroksyyli ryhmä on steerisesti hiukan estyneempi, kun taas karvakrolin hydroksyyli ryhmää varjostaa vain yksi viereinen metyyli ryhmä. Syynä synteesin epäonnistumiselle arvioitiin olevan siis mentolin steerisesti estynyt hydroksyyli ryhmä sekä jonkin verran arvioitiin olevan merkitystä sillä, onko lähtöaineena fenoli vai syklinen alifaattinen alkoholi.

#### *Betulonihappo-28-borneoliesteri*

Esteröinti tehtiin juuri valmistetun happokloridin avulla ja katalyyttinä reaktiossa oli DMAP. Reaktiovaiheen ja puhdistusten jälkeen tuotteena saatiin vaalean kellertävää kidemäistä ainetta 0,50 g, 0,85 mmol, eli 27 % teoreettisesta saannosta. Tuotteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 17) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 18). Spektreistä havaittiin seuraavat signaalit:

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.88 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 3.01 (td,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.84 (s, 1H)

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.6, 15.8, 15.9, 19.4, 19.6, 21.0, 21.3, 25.5, 26.5, 29.7, 30.3, 31.6, 33.6, 34.1, 36.0, 36.9, 38.2, 39.6, 40.7, 42.5, 46.6, 47.3, 49.1, 49.9, 55.0, 58.0, 109.9, 149.9, 171.9, 218.1

$^{13}\text{C}$ NMR-spektristä todettiin, että esteröityminen oli tapahtunut, koska betulonihapon karboksyylihapon  $\text{C}=\text{O}$ -sinaalin paikka oli siirtynyt 182,0 ppm:stä 171,9 ppm:ään. Spektristä havaittiin myös betulonihapon ketoryhmän signaali kohdassa 218,1 ppm. Spektristä laskettiin hiiliatomien lukumääräksi vain 30. Betulonihappo-28-borneoliesterissä hiiliatomien lukumäärä on 40, joten 10 hiiliatomia vaikutti puuttuvan.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä tunnistettiin betuliinirungon kaikki tunnusomaiset signaalit, mutta borneolin kahden metyyli ryhmän vetyjen signaaleja ei löydetty. Borneolin  $\text{C}_1$ -vetysignaalia ei myöskään löytynyt spektristä kemiallisen siirtymän kohdasta

4,85 ppm tai se oli olemattoman pieni. Spektrien perusteella todettiin, että betulonihappo-28-borneoliesteriä ei saatu valmistettua, mutta tuote oli kuitenkin jokin esteri.

Tuotteena ei saatu betulonihappo-28-borneoliesteriä ja tämä kävi ilmi  $^1\text{HNMR}$ - ja  $^{13}\text{CNMR}$ -spektrien tarkasteluissa, joista puuttui borneolin tunnusomaiset signaalit. Jokin esteri oli kuitenkin syntynyt, mutta tarkalleen sitä ei voitu identifioida. Borneoli on syklinen alifaattinen alkoholi kuten mentolikin. Borneolin hydroksyyli ryhmä ei ole kuitenkaan yhtä steerisesti estynyt kuin mentolissa ja oletuksena oli, että reaktio toimisi paremmin. Reaktio ei kuitenkaan toiminut toivotulla tavalla ja tämä vahvisti arviota siitä, että syklisillä alifaattisilla alkoholeilla kyseinen esteröintireaktio on vaikeammin toteutettavissa kuin fenoleilla.

#### *Betulonihappo-28-( $\alpha$ )-terpinoliesteri*

Esteröinti tehtiin juuri valmistetun happokloridin avulla ja katalyyttinä reaktiossa oli DMAP. Reaktiovaiheen jälkeen raakatuotteena saatiin tumman ruskeaa viskoosia ainetta 2,39 g. Tuote tulisi vielä puhdistaa pylväskromatografisesti ja siitä tulisi ajaa  $^1\text{HNMR}$ - ja  $^{13}\text{CNMR}$ -spektrit. Tuotteen puhdistusta ja analysointia ei ehditty tekemään enää opinnäytetyöajan puitteissa.

$\alpha$ -Terpinoli on tertiäärinen alifaattinen alkoholi, jossa on sykloheksenirunko. Aikaisempien reaktioiden perusteella tiedetään, että syklisen alifaattisten alkoholien esteröiminen on vaikeampaa kuin fenolien. Vaikka  $\alpha$ -terpinoli ei olekaan syklinen alifaattinen alkoholi sen hydroksyyli ryhmää varjostaa kaksi metyyli ryhmää ja sykloheksenirungossa voi tapahtua jonkin asteista konformaation muutosta, jolloin reaktion onnistuminen on hyvin epätodennäköistä.

#### *Betulonihappo-28-tymoliesteri*

Esteröinti tehtiin juuri valmistetun happokloridin avulla ja katalyyttinä reaktiossa oli DMAP. Reaktiovaiheen jälkeen raakatuotteena saatiin ruskeaa viskoosia ainetta 2,37 g. Tuote tulisi vielä puhdistaa pylväskromatografisesti ja siitä tulisi ajaa  $^1\text{HNMR}$ - ja  $^{13}\text{CNMR}$ -spektrit. Tuotteen puhdistusta ja analysointia ei ehditty tekemään enää opinnäytetyöajan puitteissa.

Tymoli on fenoli ja se on karvakrolin isomeeri. Tymolissa hydroksyyli-ryhmä on steerisesti hiukan estyneempi kuin karvakrolissa, koska sitä varjostaa isopropyyliryhmä. Tuotteen analysointi olisikin erittäin tärkeää, sillä sen avulla voitaisiin saada lisäselvyyttä siitä, että kuinka merkitseviä reaktioiden onnistumisen kannalta ovat steerinen este ja se, että onko lähtöaineena fenoli vai syklinen alifaattinen alkoholi.

*Betulonihappo-28-( $\alpha$ )-terpinoliesteri in-situ-reaktiolla*

Reaktion ja puhdistusvaiheiden jälkeen tuotteena saatiin keltaista saostumaa 1,39 g, 2,35 mmol eli 71,6 % teoreettisesta saannosta. Tuotteesta ajettiin  $^1\text{H}$ NMR- (liite 19) ja  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrit (liite 20).

$^{13}\text{C}$ NMR-spektristä todettiin, että betulonihapon karboksyylihapon C=O-sinaalin paikka ei ollut siirtynyt 182,0 ppm:stä esterin C=O-signaalien alueelle, joten esteröityminen ei ollut tapahtunut. Betulonihapon ketoryhmän signaali havaittiin kohdassa 218,0 ppm ja  $\alpha$ -terpinolin kaksoissidoksen hiilien signaalit kohdissa 134,0 ppm ja 120,5 ppm. Lisäksi  $^{13}\text{C}$ NMR-spektristä laskettiin hiiliatomien lukumääräksi 40, joka vastasi betulonihappo-28-( $\alpha$ )-terpinoliesterin hiiliatomien lukumäärää.  $^1\text{H}$ NMR-spektristä havaittiin betuliinirungon tunnusomaiset signaalit sekä  $\alpha$ -terpinolin metyyli-ryhmien vetysignaalit. Spektrin perusteella tuotteessa oli paljon reaktiovaiheissa jääneitä epäpuhtauksia mm. liuottimia. Vaikka spektreistä löytyi molempien lähtöaineiden rungot,  $^{13}\text{C}$ NMR-spektrin perusteella esteröitymistä ei ollut tapahtunut ja näin ollen betulonihappo-28-( $\alpha$ )-terpinoliesteriä ei saatu valmistettua.

Johtopäätöksenä oli, että in-situ-reaktio ei ollut riittävän tehokas menetelmä kyseiseen betulonihapon ja  $\alpha$ -terpinolin esteröimiseen.

Liitteessä 21 on esitetty synteesisarjassa onnistuneiden synteesituotteiden kokoava taulukko.



## 5.6 Synteesituotteiden bioaktiivisuustestit

Onnistuneille synteesituotteille, joita olivat betuliini-28-ferulihappoesteri, betulonihappo-28-vaniliiniesteri ja betulonihappo-28-karvakroliesteri, on tehty ja tullaan tekemään bioaktiivi-suustestejä esimerkiksi Leishamania- tautia vastaan, antiviruseriaineena, antibakteerieriaineena ja tulehduksia estävänä aineena. Lisäksi tuotteista tullaan tutkimaan niiden sytotoksisuutta normaaleja soluja kohtaan sekä soveltuvuutta mahdollisiksi kasvintorjunta- aineiksi.

Synteesituotteet ovat osoittautuneet lievästi aktiivisiksi jo muutamissa testeissä, mutta kaikkia tuloksia ei ole vielä saatu. Tutkimuksia ja bioaktiivi- suustestejä kannattaa ehdottomasti jatkaa, jotta saadaan selvitettyä tuotteiden kaikki ominaisuudet, vaikutukset ja soveltuvuudet edellä maini- tuissa testeissä.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn tavoitteena oli valmistaa betuliinin ja betulonihapon estereitä, joita esiteltiin opinnäytetyön osiossa 4 synteetit. Teoriaosuudessa esiteltyjä synteesimenetelmiä kokeiltiin useilla eri lähtöaineilla ja kaikkia synteesejä ei ollut tarkoituksenmukaista esitellä opinnäytetyössä.

Synteesisarjaan suunniteltuja betuliinin ja betulonihapon synteesituotteita ei ollut aikaisemmin valmistettu ja näin ollen tutkimusryhmällä ei ollut tarkkaa tietoa varmoista ja toimivista synteesimenetelmistä. Vain kokeilemalla erilaisia synteesimenetelmiä voitiin todeta, mitkä menetelmistä olivat toimivia ja mitkä eivät.

Yleisesti voitiin todeta, että betuliinin esteröintireaktiot toimivat huomattavasti paremmin kuin betulonihapon esteröinnit. Esimerkiksi betuliini-28-ferulihappoesterin ja betulonihappo-28-karvakroliesterin synteeseissä käytettiin samaa esteröintimenetelmää, jossa katalyyttinä oli titaani(IV)isopropylaatti. Betuliinin esteröinti onnistui, kun taas betulonihapon esteröinti ei onnistunut. Lähtökohtaisesti voitiin siis todeta, että betulonihapon esteröinnit olivat hankalampia kuin betuliinin ja yhtenä syynä tähän saattoi olla betulonihapon huono liukoisuus liuottimiin.

Betulonihappo ei liukene esimerkiksi veteen ja hyvin heikosti mm. heksaaniin. Erilaisia liuottimia kokeiltaessa huomattiin, että THF, tolueni ja ksyleeni liuottivat betulonihappoa kohtuullisesti. Suuri ongelma tällä hetkellä betuliinilla ja sen johdannaisiin liittyvillä lääkeainesovelluksilla onkin juuri niiden huono liukoisuus vesipohjaisiin liuottimiin [3, s. 6349 - 6358]. Betulonihapon huono liukoisuus orgaanisiin liuottimiin aiheutti ongelmia myös pylväskromatografisissa puhdistuksissa sekä NMR-mittauksissa.

Betulonihapon heikompaan esteröitymiseen vaikuttavat todennäköisesti myös steeriset esteet, koska esteröitymisreaktio alkaa betulonihapon karbonyylihiilestä, johon alkoholin hydroksyyli ryhmä reagoi. Jos alkoholi on vielä sekundaarinen tai tertiaarinen, niin sekin voi aiheuttaa lisää steerisiä esteitä. Betuliinilla sitä vastoin hydroksyyli ryhmä on yhden sidoksen kauempana betuliinin muodostamasta tasosta ja näin ollen reagoi helpommin karboksyylihapporyhmän kanssa.

### *Esteröinnit p-tolueenisulfohappo-katalyytillä*

Betulonihapon esteröintireaktioita *p*-tolueenisulfonihappo-katalyytillä kokeiltiin kahdella eri lähtöaineella, karvakrolilla ja mentolilla. Kummassakaan synteesissä esteröitymistä ei tapahtunut. Johtopäätöksenä todettiin, että *p*-tolueenisulfonihappo ei ollut riittävän tehokas katalyytti betulonihapon esteröintireaktioihin.

### *Esteröinnit titaani(IV)isopropylaatti-katalyytillä*

Esteröintireaktioita titaani(IV)isopropylaatilla kokeiltiin myös sekä betuliinilla, että betulonihapolla. Betuliinin esteröinti toimi hyvin ja tuotteena saatiin betuliini-28-ferulihappoesteriä, kun taas betulonihapon reaktiot eivät onnistuneet. Johtopäätöksenä voitiin myös titaani(IV)isopropylaatin suhteen todeta, että se ei ollut riittävän tehokas katalysoimaan, betuliinia vaikeammin esteröityvän, betulonihapon reaktioita.

### *Esteröinnit N-(3-dimetyyliaminopropyli)-N'-etyylikarbamidihydrokloridilla*

Betulonihapon esteröintiä EDC-kytkentäreagenssilla kokeiltiin kahdella eri lähtöaineella, karvakrolilla ja kanelialkoholilla. Kummallakaan kerralla esteröitymistä ei ollut tapahtunut, mikä todettiin NMR-spektrien perusteella. Spektreistä voitiin kuitenkin havaita betulonihapon ja lähtöaineiden rungot. Johtopäätöksenä todettiin, että kyseinen menetelmä ei ollut riittävän tehokas betulonihapon esteröimiseen.

### *Esteröinnit happokloridilla*

Betulonihappokloridin synteesiä tehtiin yhteensä yhdeksän. Hyvin nopeasti todettiin, että betulonihappokloridin avulla tehdyt betulonihapon esteröinnit onnistuivat huomattavasti paremmin kuin muilla menetelmillä tehdyt. Betulonihappokloridin havaittiin tosin menettävän reaktiivisuutensa melko nopeasti kuten sivulla 46 osioissa 5.6 *betulonihappokloridi ja esteröintireaktiot* todettiin.

Yhdeksästä betulonihappokloridin synteesistä erityyppisillä alkoholeilla ja fenoleilla kaksi saatiin onnistumaan, viisi epäonnistui ja kaksi jäi raakatuotevaiheeseen. Onnistuneita olivat betulonihappo-28-vaniliiniesterin ja betulonihappo-28-karvakroliesterin synteesit. Epäonnistuneissa synteesissä betulonihappokloridi oli joko menettänyt reaktiivisuutensa tai

lähtöaineina olivat sykliset alifaattiset alkoholit tai tertiäärinen alkoholi. Raakatuotevaiheeseen jääneitä tuotteita ei ehditty analysoida.

Onnistuneissa synteeseissä lähtöaineet olivat fenoleja. Fenoleissa hydroksyyli-ryhmä kiinnittyy tasomaiseen, jäykkärakenteiseen bentseeni- renkaaseen. Syklisillä alifaattisilla alkoholeilla rengasrakenteessa sitä vastoin voi esiintyä konformaation muutosta, mikä vaikeuttaa reaktioiden onnistumista ja voi johtaa siihen, että hydroksyyli-ryhmä on steerisesti estyneempi. Esimerkiksi optisesti aktiivisen mentolin tuoli- ja vene-muodot vaikuttavat hydroksyyli-ryhmän steeriseen esteeseen.

Johtopäätöksenä oli, kuten edellä jo todettiin, että lähtöaineella ja steerisellä esteellä on merkittävä vaikutus betulonihappokloridin esteröintireaktioiden onnistumiseen.

#### *Yhteenveto*

Yhteensä erilaisia betuliiniin ja betulonihapon synteesejä tehtiin 25. Osa reaktioista toimi kuten oli suunniteltu ja osa ei toiminut. Synteesisarjaan suunnitelluista yhdeksästä lopputuotteesta saatiin loppujen lopuksi valmistettua onnistuneesti kolme lopputuotetta, jotka olivat betuliini-28-ferulihappoesteri, betulonihappo-28-vaniliiniesteri ja betulonihappo-28-karvakroliesteri. Kaikkia bioaktiivisuustestien tuloksia ei ole vielä saatu, mutta osassa testeistä kyseiset tuotteet ovat osoittautuneet jo lievästi aktiivisiksi. Kyseisten tuotteiden testaamista sekä betuliiniin ja sen johdannaisiin liittyvää syntetiikkaa ja tutkimustyötä kannattaa jatkaa, koska betuliinijohdannaisilla voi olla ratkaiseva merkitys esimerkiksi sairauksien hoidossa.

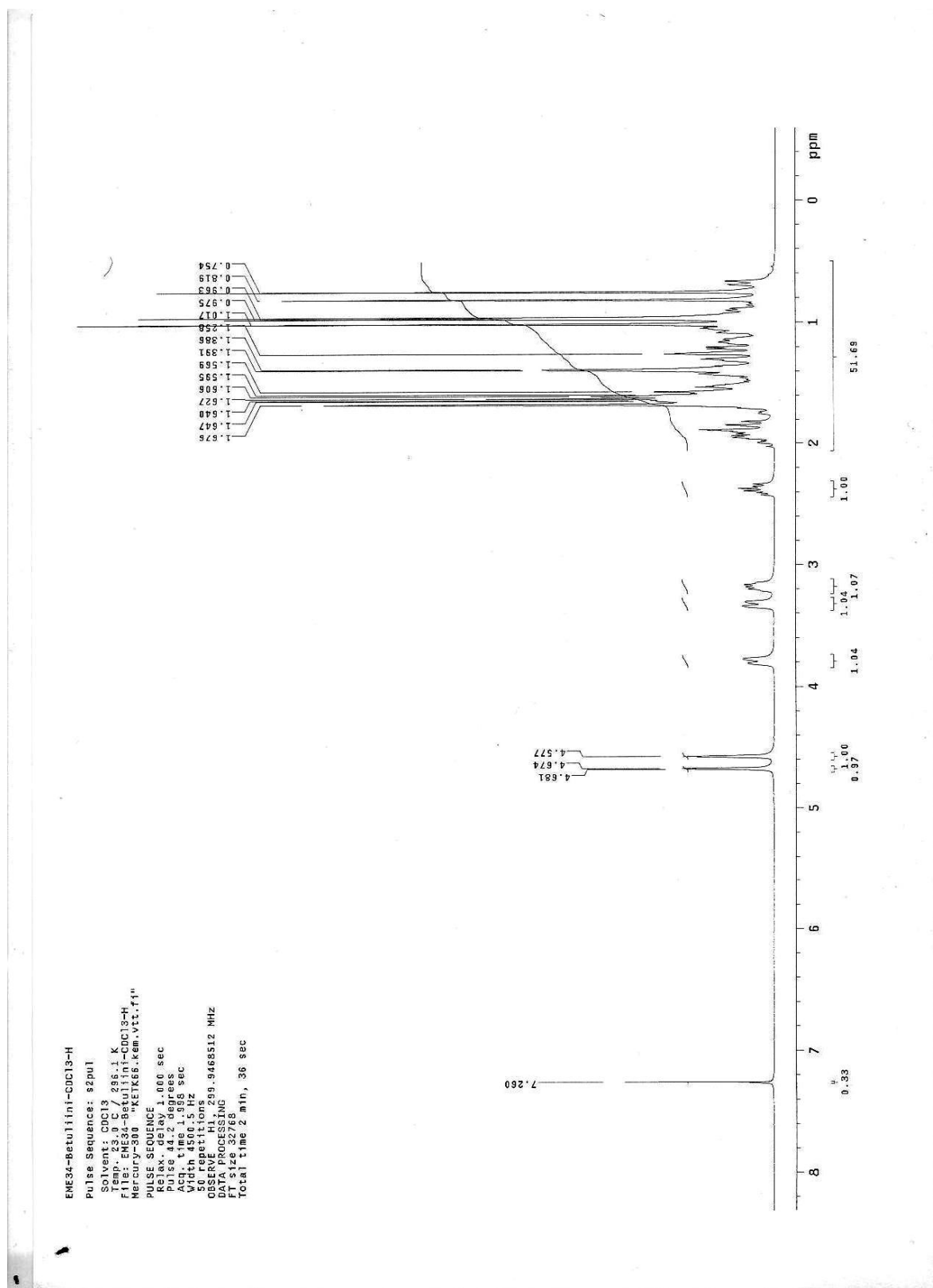
## VIITELUETTELO

- [1] Alakurtti, Sami - Mäkelä, Taru - Koskimies, Salme - Yli-Kauhaluoma, Jari, *Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin*. European journal of pharmaceutical sciences No. 29. (2006), s. 1 - 11.
- [2] Petrenko N., I., et al., *Synthesis of betulonic acid derivatives containing amino-acid fragments*. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 38. No. 4. (2002), s. 331 - 339.
- [3] Saxena, Brij, B., et al., *Boc-lysinated-betulonic acid: A potent, anti-prostate cancer agent*. Bioorganic & medicinal chemistry Vol. 14. No. 18. (2006), s. 6349 - 6358.
- [4] Eckerman, Christer – Ekman, Rainer, *Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste*. Paperi ja puu 3 (1985), s. 100.
- [5] Krasutsky, Pavel, A., et al., *Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark*. United States Patent. 7264184. (2002).
- [6] Hart, Harold – Craine, Leslie, E. – Hart, David, J., *Organic Chemistry A Short Course*. 10<sup>th</sup>. Edition. Boston, USA: Houghton Mifflin Company. 1999.
- [7] Kim, Darrick, S., H., L., et al., *A concise semi-synthetic approach to betulonic acid from betulin*. Synthetic communications Vol. 27. No. 9. (1997), s. 1607 - 1612.
- [8] Johnson, William, A., *Invitation to Organic Chemistry*, University of North Dakota, USA: Jones and Bartlett Publishers. 1999.
- [9] Paquette, Leo A., *Encyclopedia of Reagents for organic synthesis*. Vol. 7. The Ohio State University, Columbus, OH, USA: John Wiley & Sons 1995.
- [10] Blandy, Claudine – Pellegatta, Jean-Louis – Cassoux Patrick, *Homogenous and supported titanates as catalysts for transesterification of acrylic esters*. Catalysis Letters No. 43. (1997), s. 139 - 142.
- [11] Fox, Marye, Anne – Whitesell, James, K., *Organic Chemistry*. 2<sup>nd</sup>. Edition. The University of Texas, Austin, Texas, USA: Jones and Bartlett Publishers. 1997.
- [12] Adams, Roger – Ulich, L., H., *The use of oxalyl chloride and bromide for producing acid chlorides, acid bromides or acid anhydrides. III*. Contribution from the Chemical Laboratory of the University of Illinois. (1920), s. 599 - 611.
- [13] Wade, L. G., Jr., *Organic Chemistry*, 6<sup>th</sup>. Edition. Richland College, Dallas, TX, USA: Prentice Hall. 2006. [verkkodokumentti, viitattu 15.10.2007]. Saatavissa: [http://faculty.inverhills.edu/jthoen/files/chapter\\_21b.ppt](http://faculty.inverhills.edu/jthoen/files/chapter_21b.ppt).
- [14] Berry, Donald, J., et al., *Catalysis by 4-dialkylaminopyridines*. Arkat, USA. (2001). [verkkodokumentti, viitattu 15.10.2007]. Saatavissa: <http://www.arkat-usa.org/home.aspx?VIEW=MANUSCRIPT&MSID=401>.

- [15] Balasubramanian, M. - Murugan, R. - Scriven E. F. V., *Specialty Chemicals*, June, (2001). [verkkodokumentti, viitattu 16.10.2007]. Saatavissa: <http://www.dmapcatalyst.com/chemistry.htm>.
- [16] Klemenc, S., *4-dimethylaminopyridine as a catalyst in heroin synthesis*. Forensic Science International No.129. (2002), s. 194 - 199.
- [17] Augeri, David, J., et al., *Potent and Selective Non-Cysteine-Containing Inhibitors of Protein Farnesyltransferase*. Journal of Medicinal Chemistry Vol. 41. No. 22. (1998), s. 4288 - 4300.
- [18] Greene & Wuts, *Protective groups in organic synthesis*. 2<sup>nd</sup>. Edition. USA: John Wiley & Sons. 1991.
- [19] Kishuku, Hidetoshi – Shindo, Mitsuru – Shishido, Kozo, *Enantioselective total synthesis of (-)-heliannuol A*. Chemical Communications. (2003), s. 350 - 351.
- [20] Greene & Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*. New York, USA: Wiley-Interscience. 1999. [verkkodokumentti, viitattu 11.10.2007].  
Saatavissa:  
<http://www.organic-chemistry.org/protectivegroups/hydroxyl/tbdms-ethers.htm>
- [21] Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka, *Laboratorion analyysitekniikka*. 5. painos. Helsinki: Edita. 2005.
- [22] Maitland, Jones Jr., *Organic Chemistry*. 2<sup>nd</sup>. Edition. Princeton University, USA: W.W. Norton & Company, inc. 2000.
- [23] Simonen, Tapio, *Orgaanisen kemian synteettiset työmenetelmät*. 3 - 1. painos. Vantaa: Dark Oy. 2004.

**LIITELUETTELO**

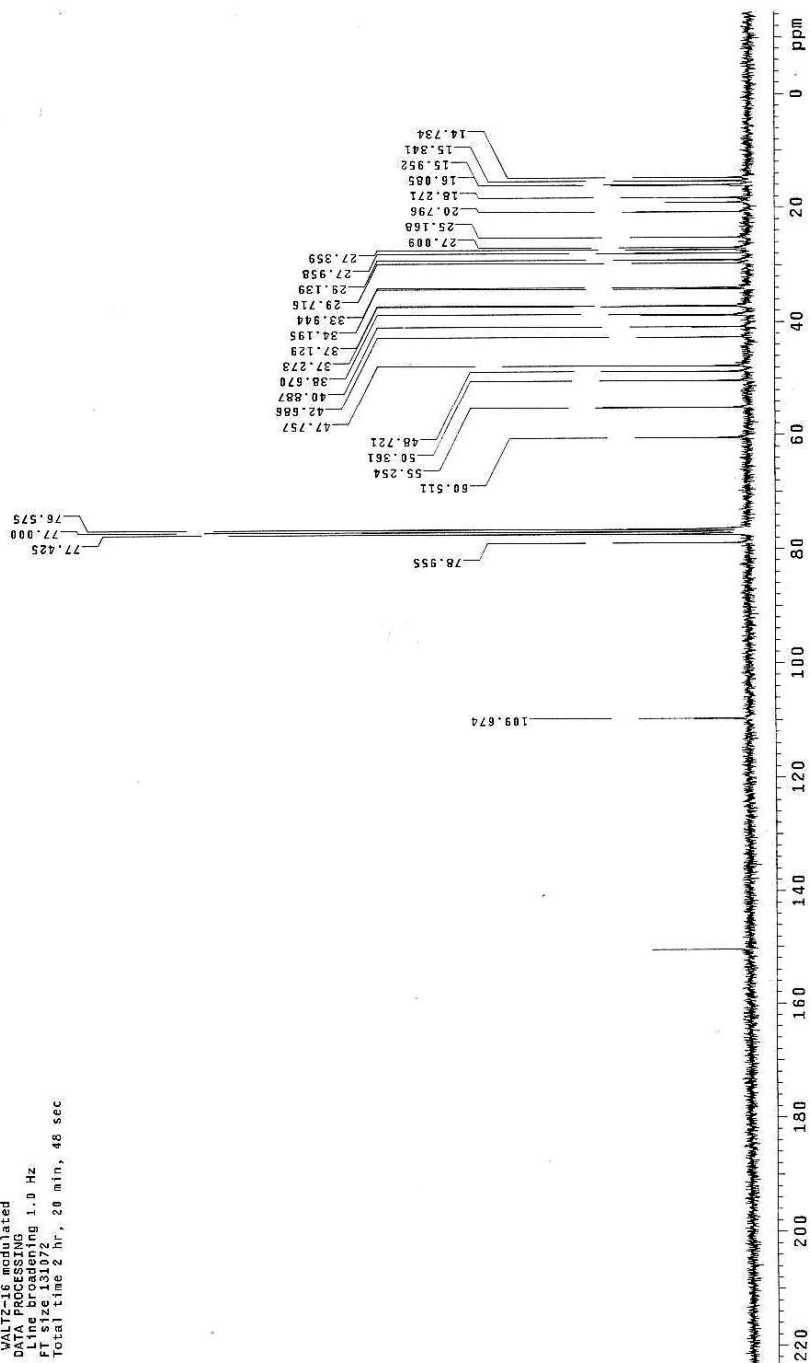
<b>Liite 1</b>	<b>Betuliinin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 2</b>	<b>Betuliinin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 3</b>	<b>Betulonihapon <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 4</b>	<b>Betuliini-28-ferulihappoesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 5</b>	<b>Betuliini-28-ferulihappoesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 6</b>	<b>Betuliini-28-ferulihappoesterin IR-spektri</b>
<b>Liite 7</b>	<b>Betulonihappo-28-kanelialkoholiesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 8</b>	<b>Betulonihappo-28-kanelialkoholiesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 9</b>	<b>Betulonihappo-28-vaniliiniesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 10</b>	<b>Betulonihappo-28-vaniliiniesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 11</b>	<b>Betulonihappo-28-vaniliiniesterin IR-spektri</b>
<b>Liite 12</b>	<b>Betulonihappo-28-karvakroliesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 13</b>	<b>Betulonihappo-28-karvakroliesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 14</b>	<b>Betulonihappo-28-karvakroliesterin MS-spektri</b>
<b>Liite 15</b>	<b>Betulonihappo-28-mentoliesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 16</b>	<b>Betulonihappo-28-mentoliesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 17</b>	<b>Betulonihappo-28-borneoliesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 18</b>	<b>Betulonihappo-28-borneoliesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 19</b>	<b>Betulonihappo-28-<math>\alpha</math>-terpinoliesterin <sup>1</sup>HNMR-spektri</b>
<b>Liite 20</b>	<b>Betulonihappo-28-<math>\alpha</math>-terpinoliesterin <sup>13</sup>CNMR-spektri</b>
<b>Liite 21</b>	<b>Kokoava synteesitaulukko</b>

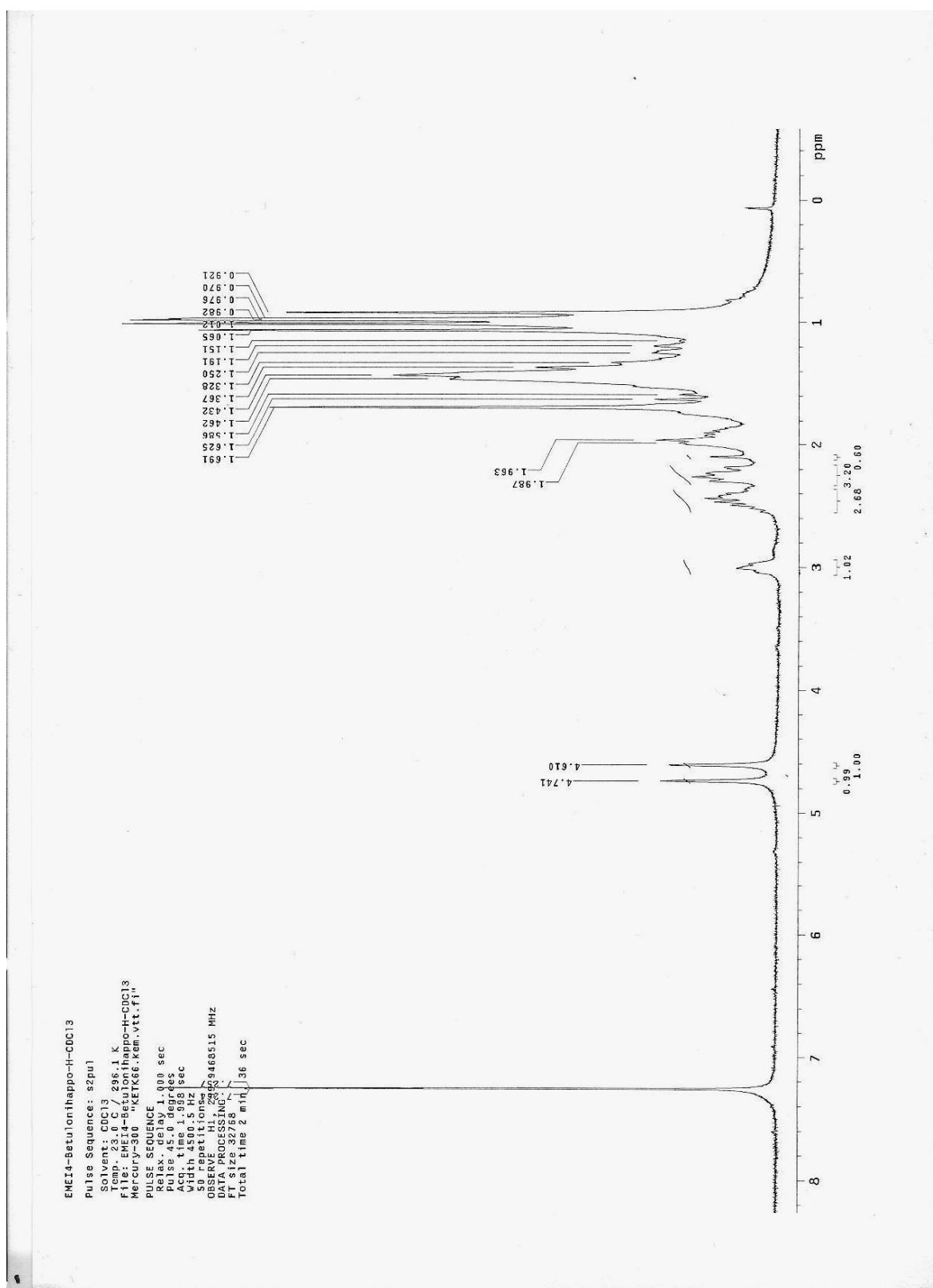
Betuliinin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

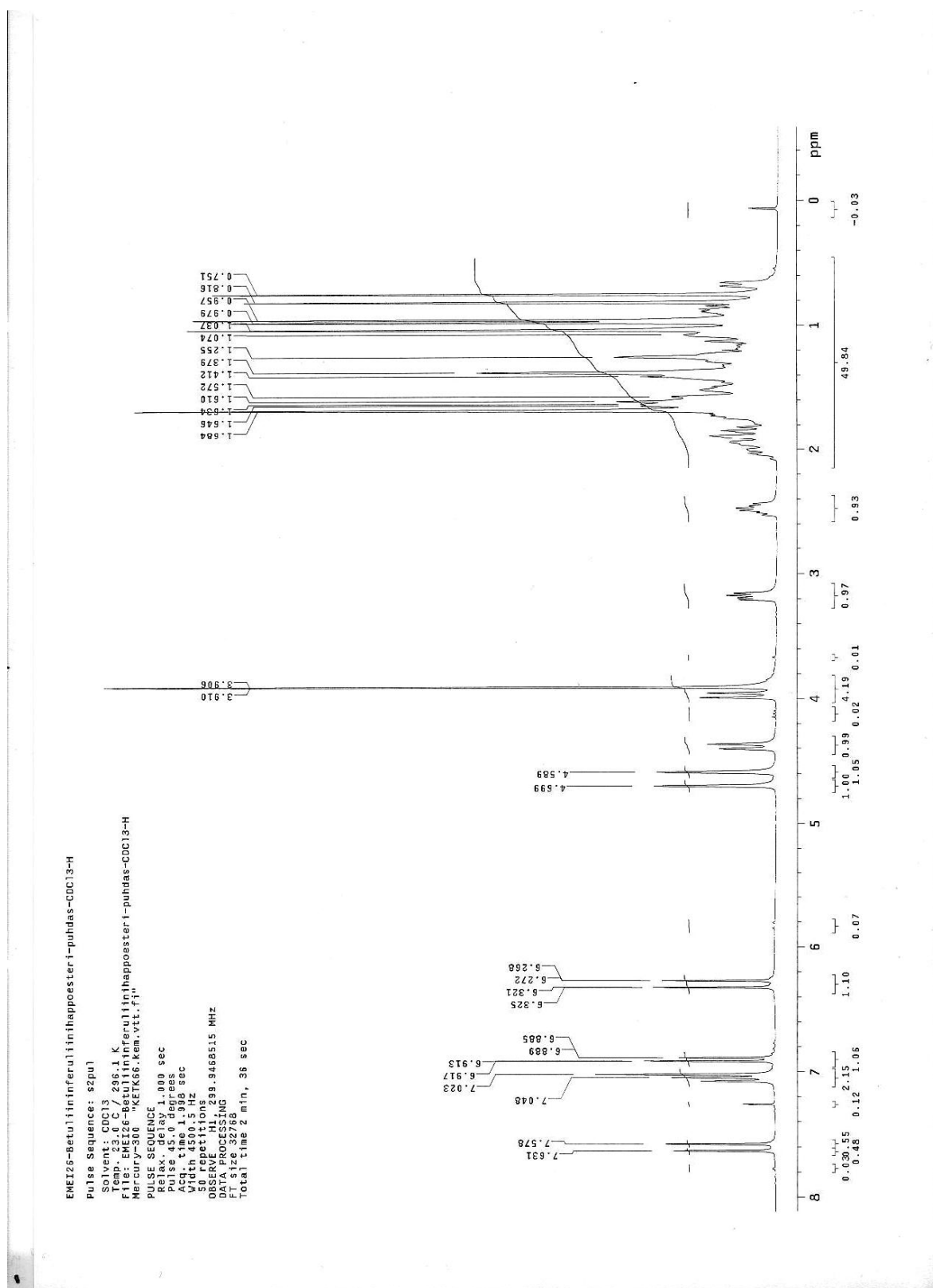


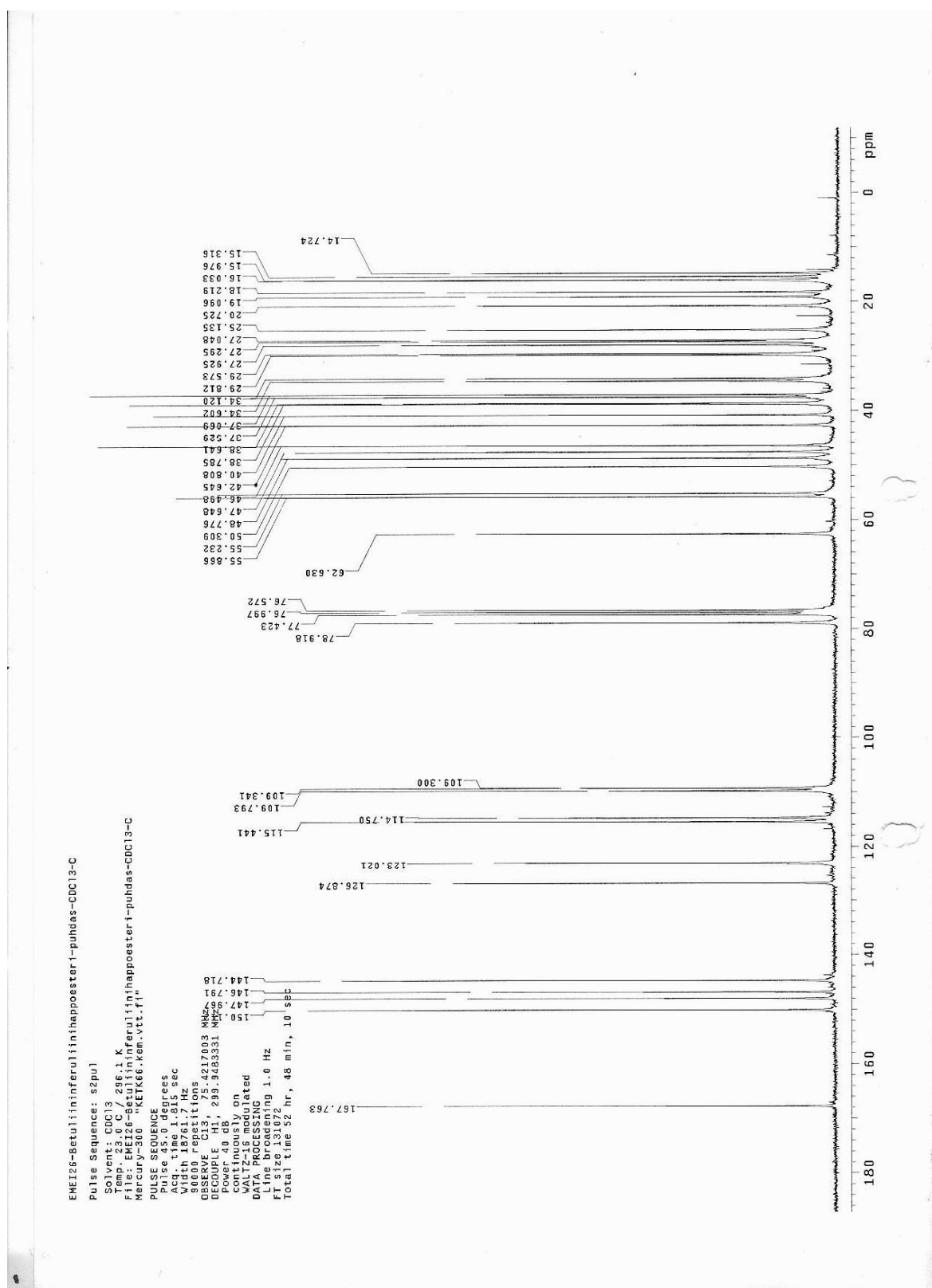
Betuliinin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

ENE34-Betuliini-CDCl<sub>3</sub>-C  
 Pulse Sequence: s2pul  
 Solvent: CDCl<sub>3</sub> 298.1 K  
 Mercury-300 "KETX66.kem.vtt.ft"  
 PULSE SEQUENCE  
 Pulse 43.9 degrees  
 Acq. time 1.015 sec  
 Width 10761.7 Hz  
 SSB: Spect 10761.7 Hz  
 DECOUPLE "H1", 249.9483331 MHz  
 Power 40 dB  
 continuously on  
 VALT: 16 modulated  
 D1: 1.00 sec  
 Line broadening 1.0 Hz  
 FT size 131072  
 Total time 2 hr, 20 min, 48 sec



Betulonihapon  $^1\text{H}$ NMR-spektri

Betuliini-28-ferulihappoesterin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

Betuliini-28-ferulihappoesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

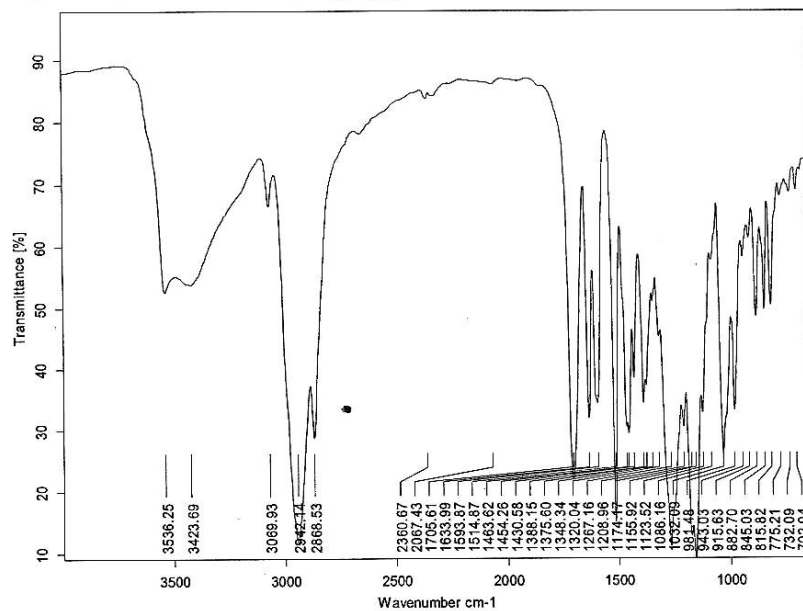
## Betuliini-28-ferulihappoesterin IR-spektri

IR betuliini

C:\Program Files\Opus\MEAS\DATA\isami.1 EME 26

25.9.2007 SAL

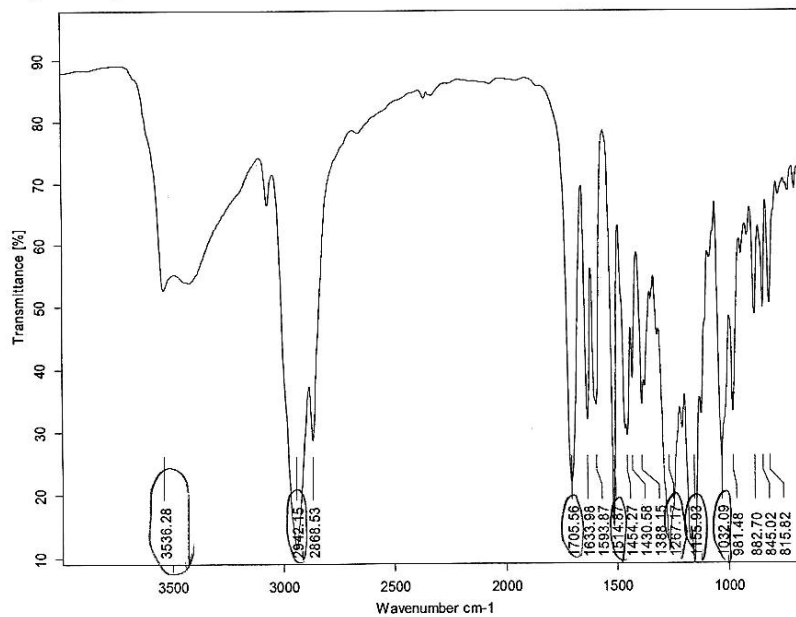
9/25/2007 3:38:49 PM



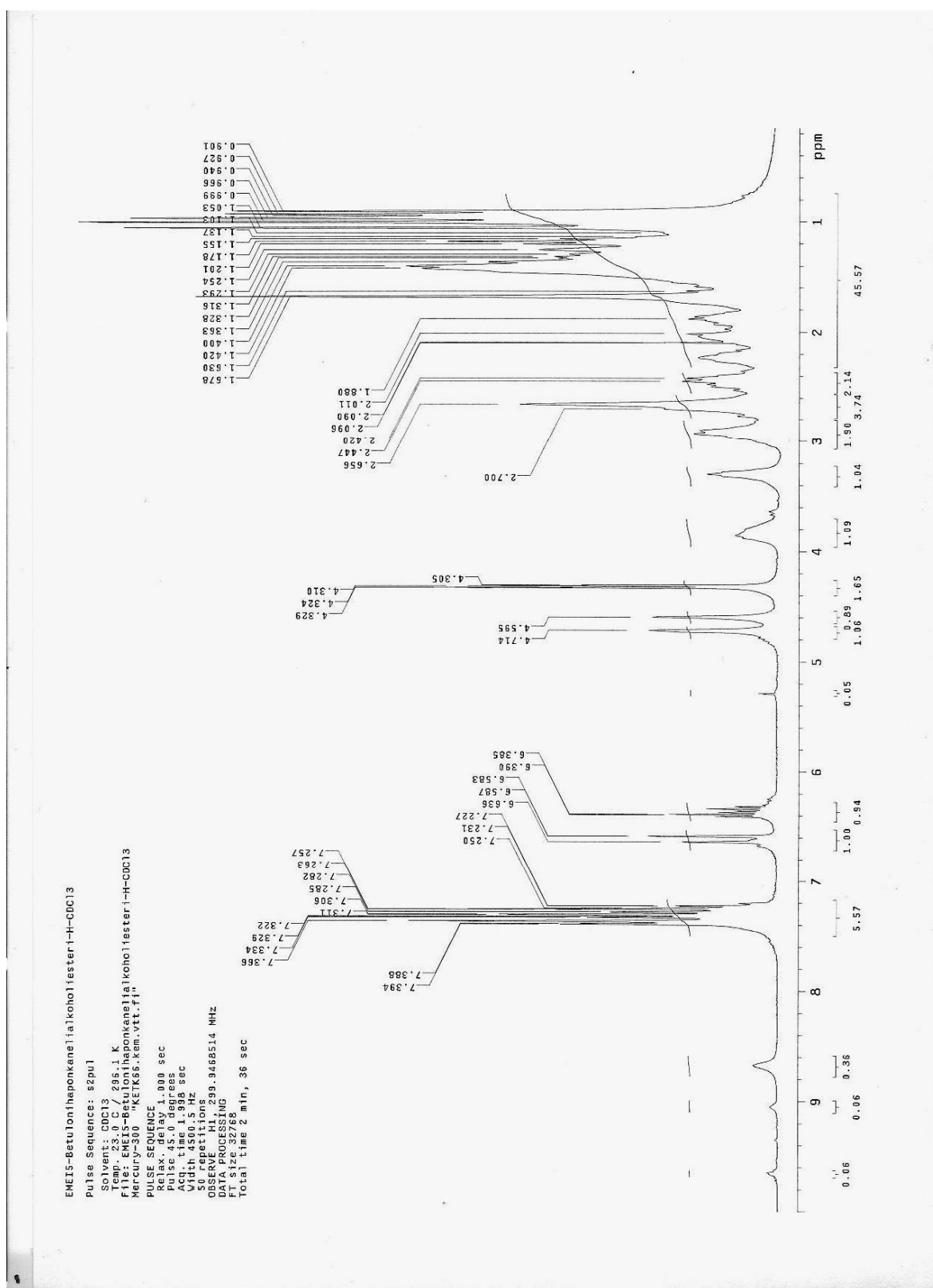
Page 1 of 1

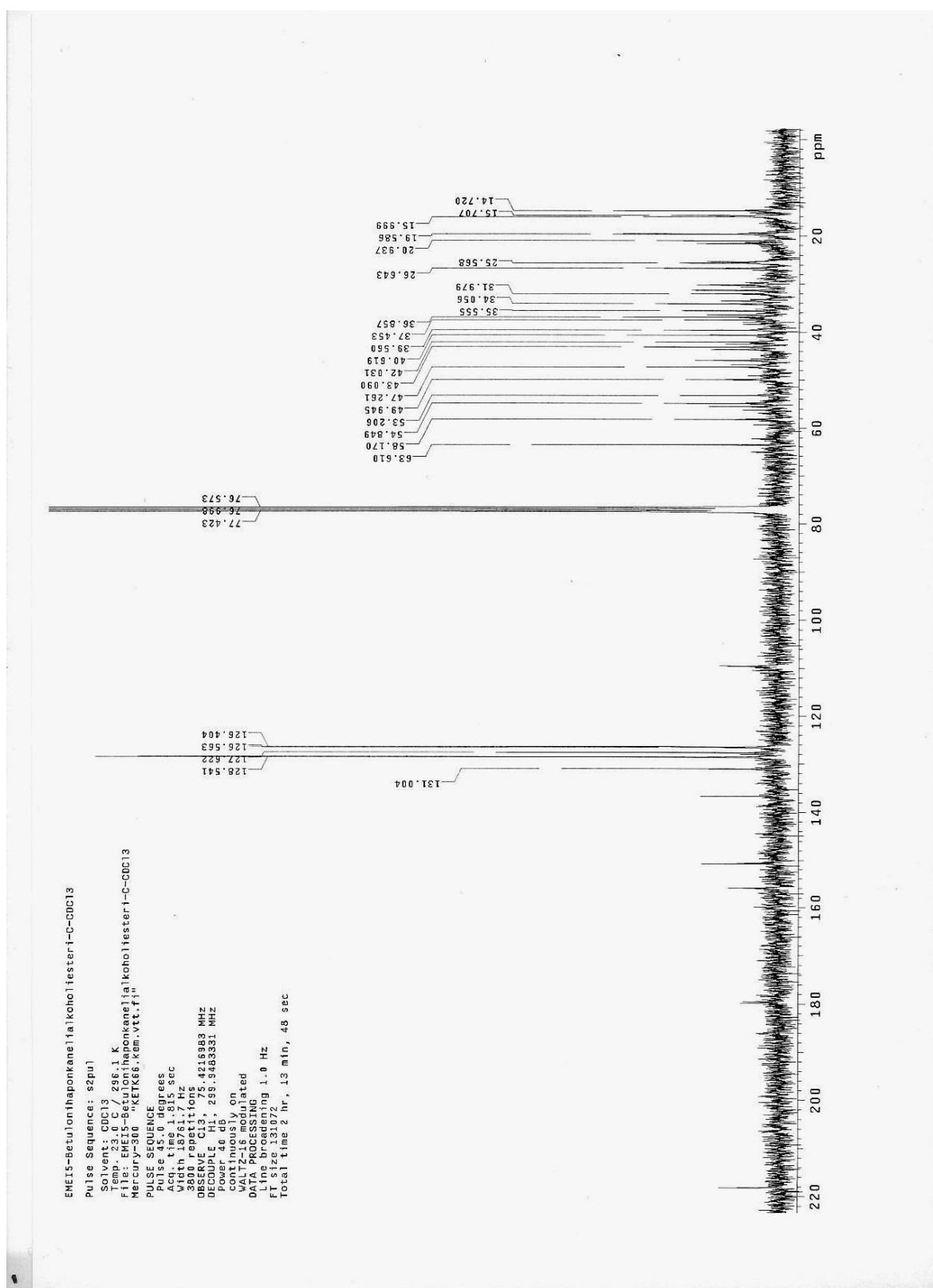
C:\Program Files\Opus\MEAS\DATA\isami.1 EME 26.0

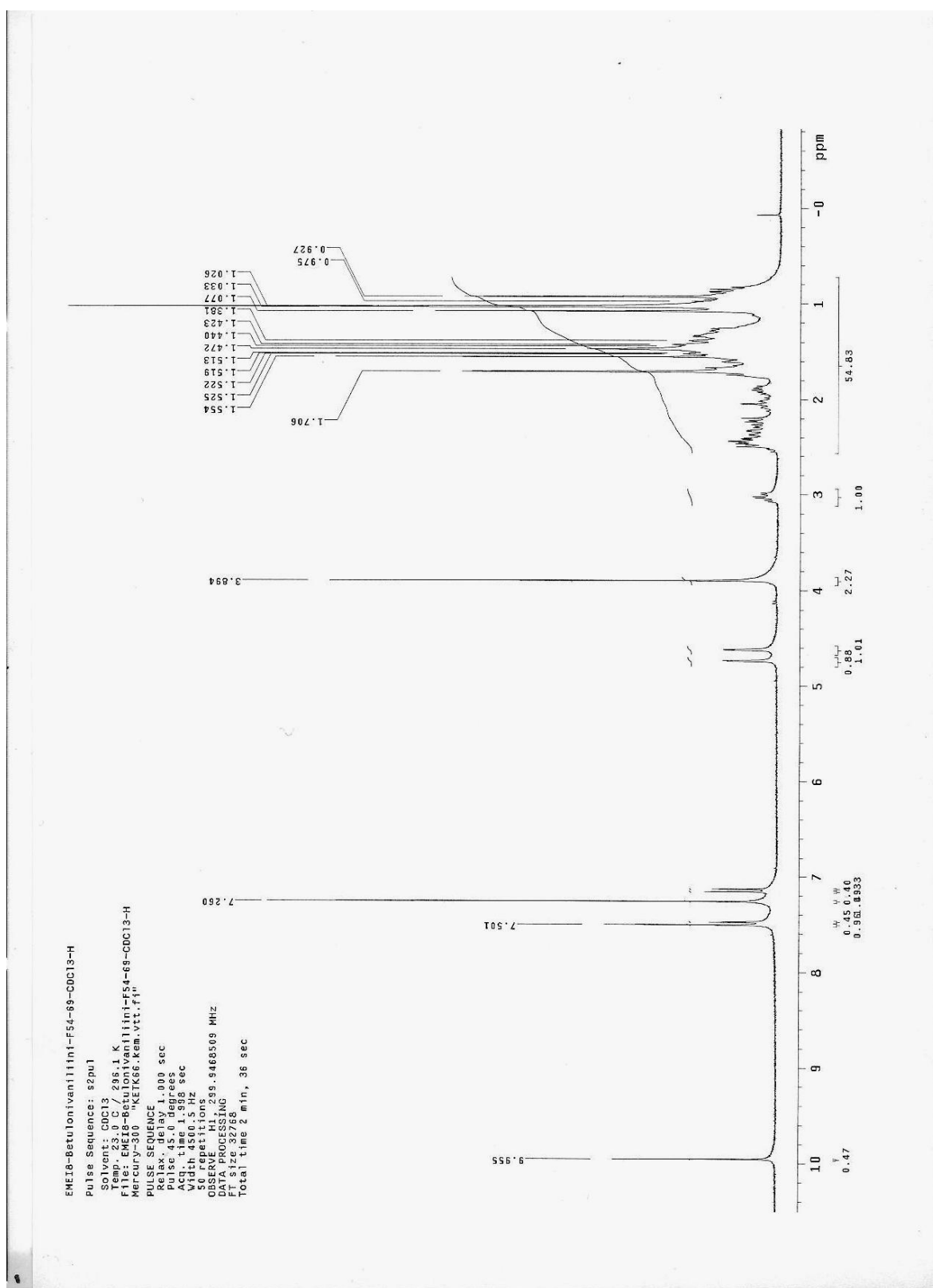
9/25/2007 3:40:44 PM



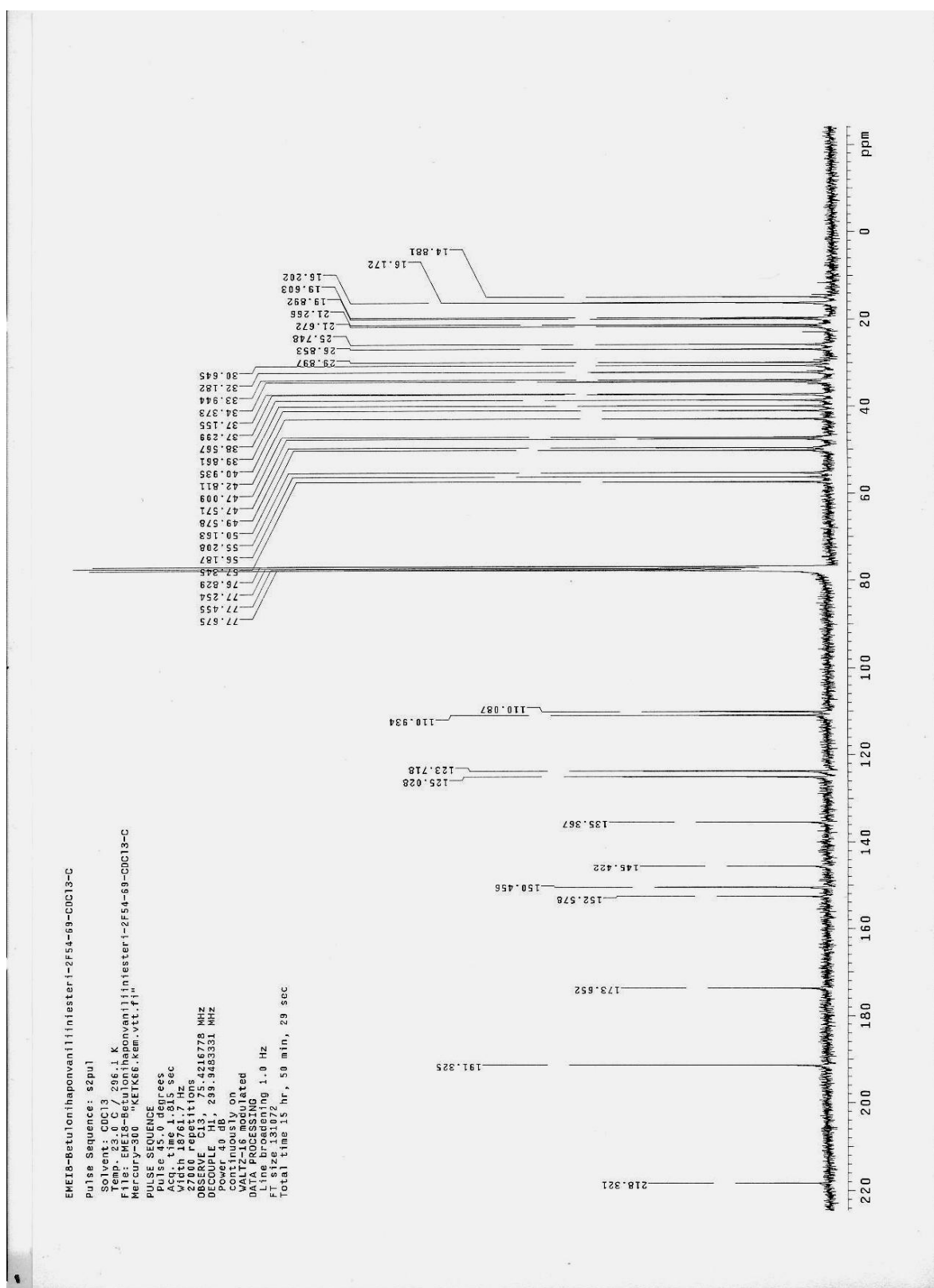
Page 1 of 1

Betuloniippo-28-kanelialkoholiesterin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

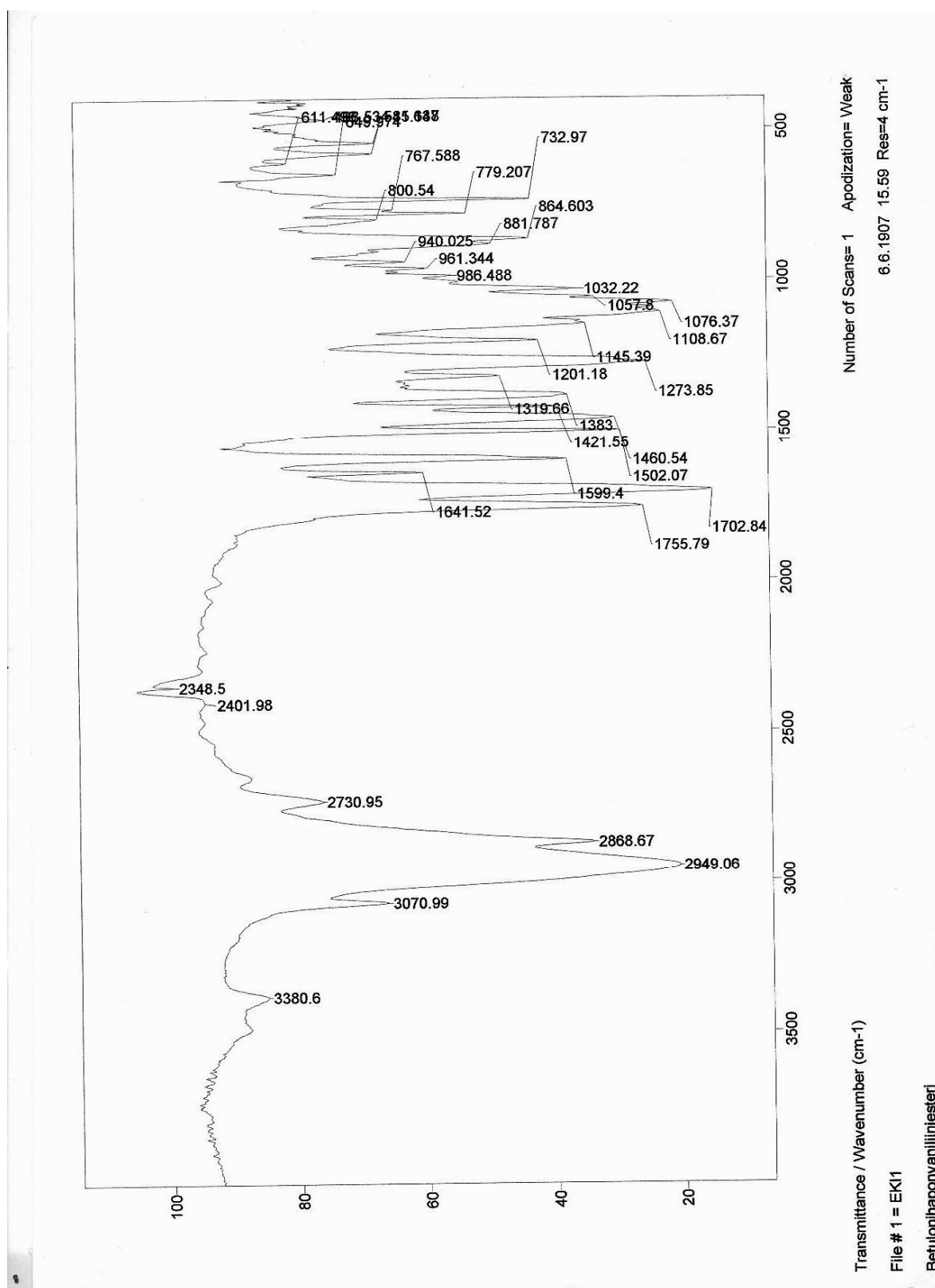
Betulonihapo-28-kanelialkoholiesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

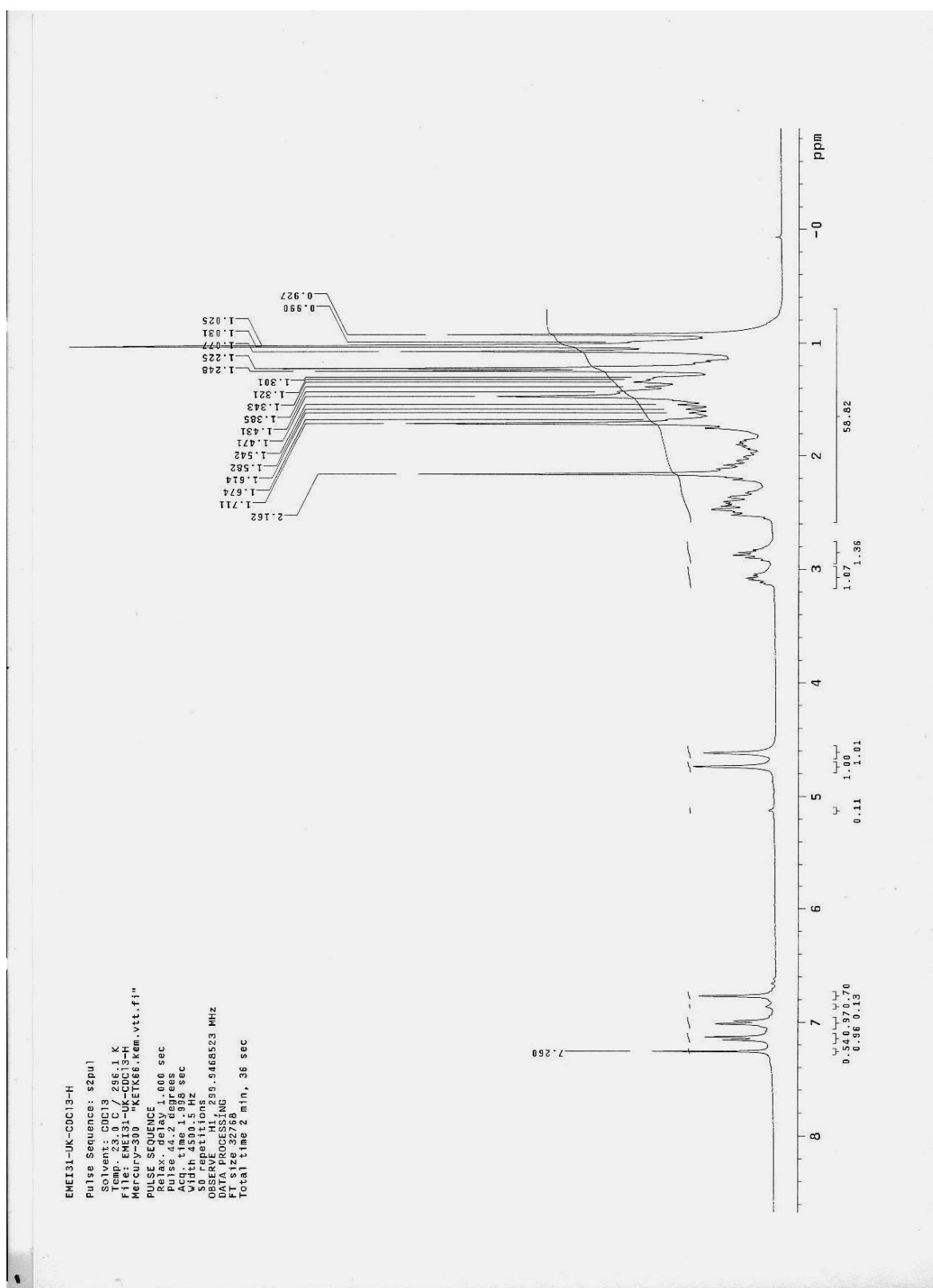
Betuloniippo-28-vaniliiniesterin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

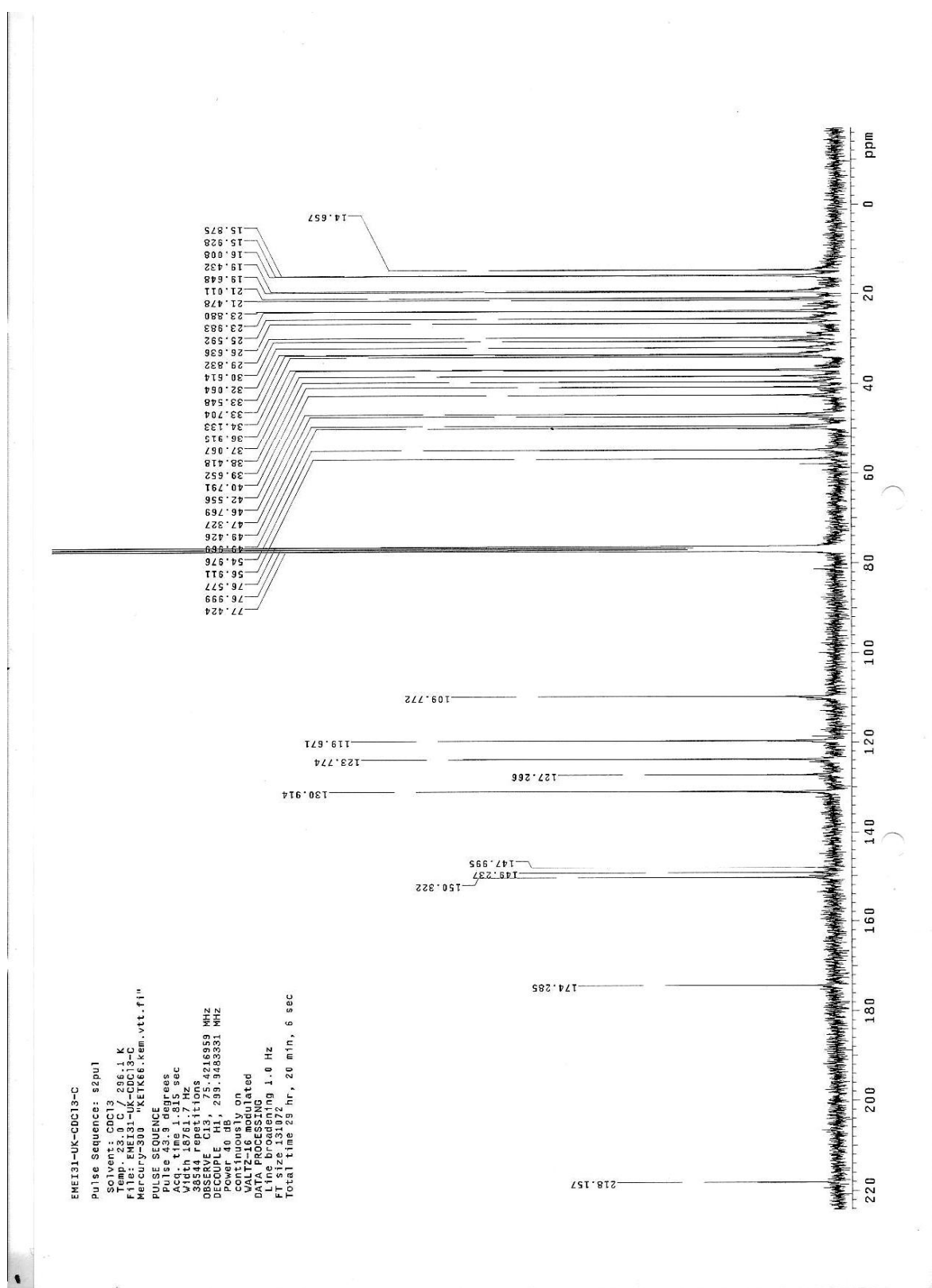


Betuloniippo-28-vaniliiniesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

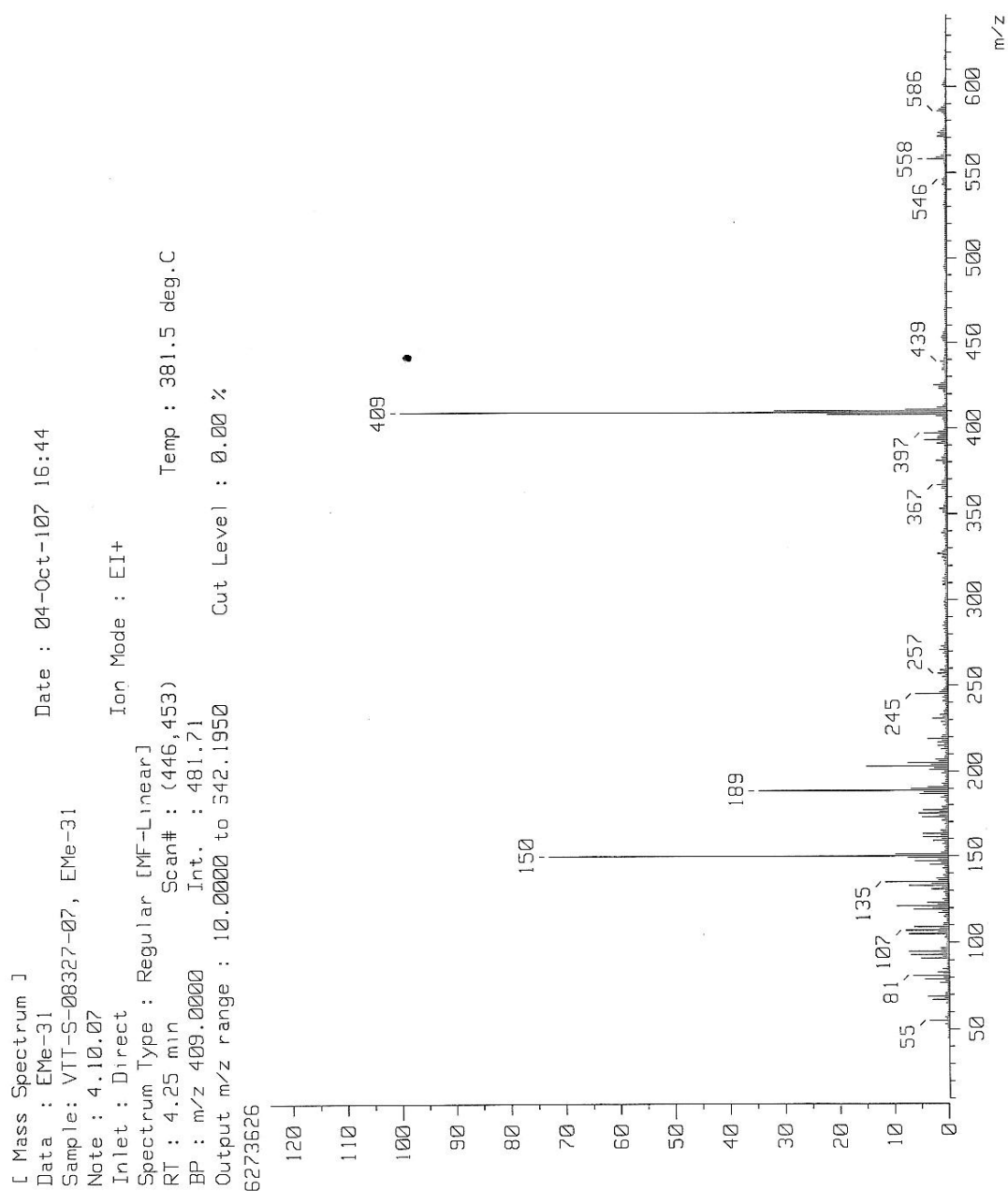
## Betulonihappy-28-vaniliiniesterin IR-spektri

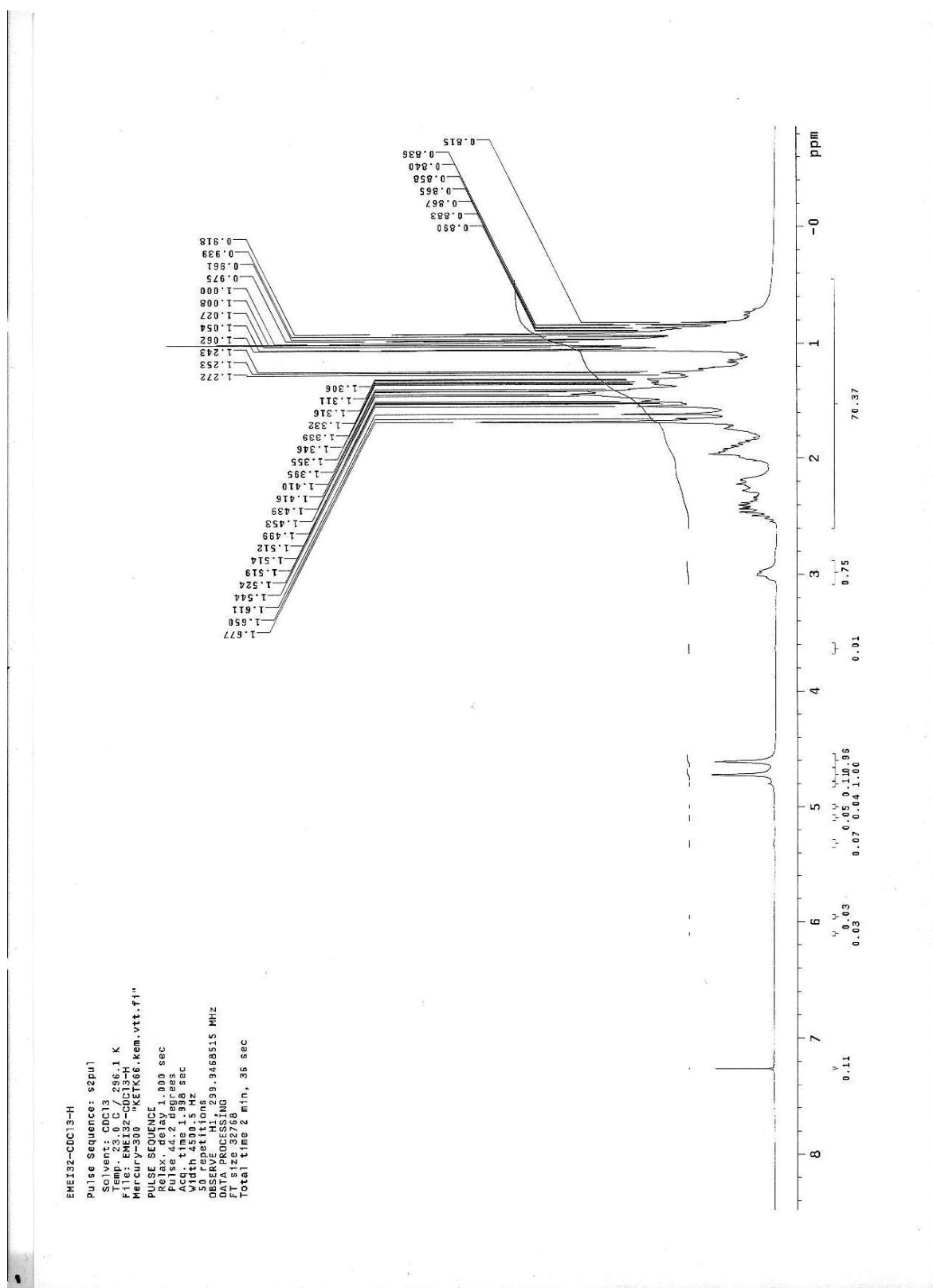


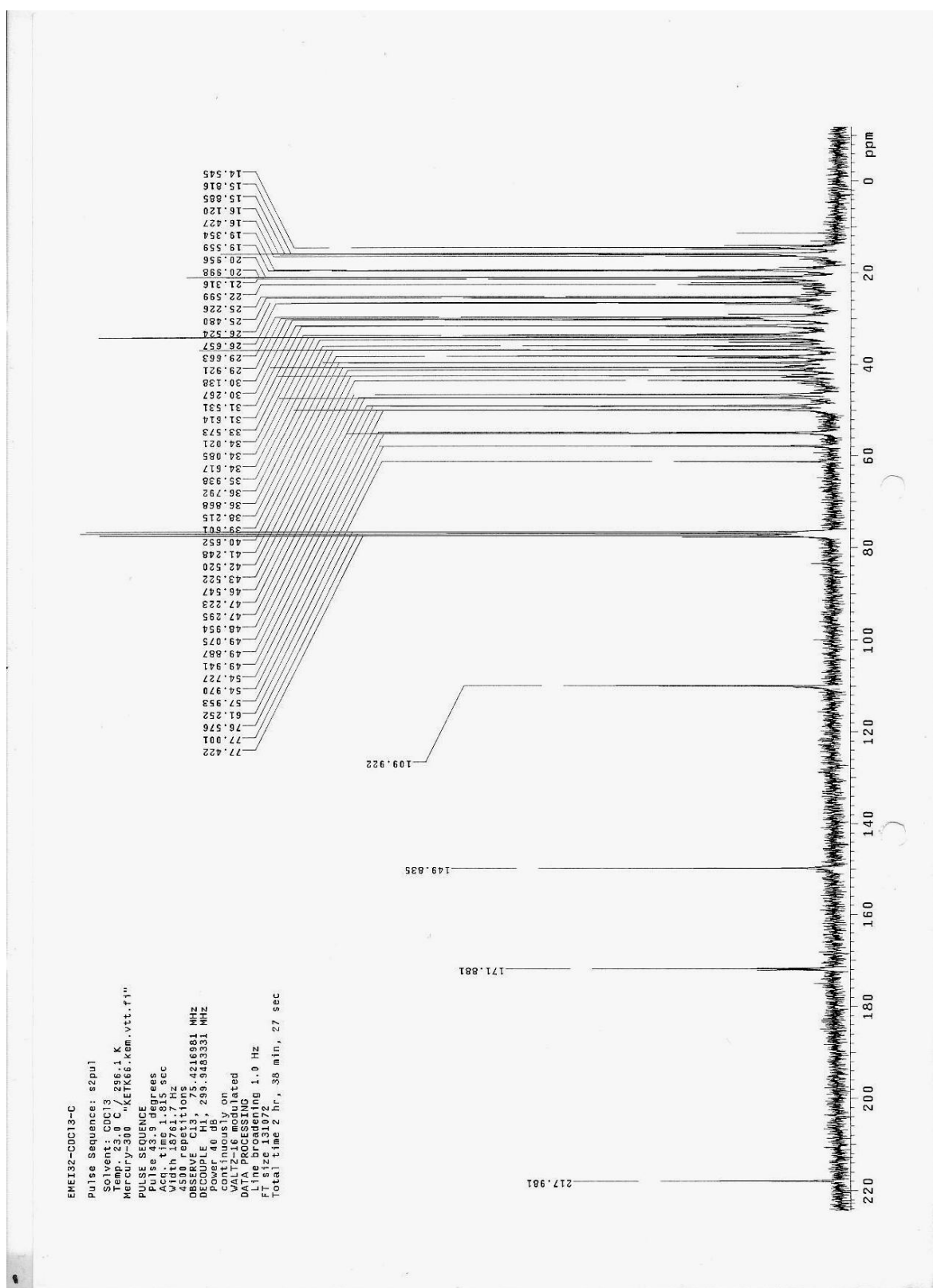
Betulonihapo-28-karvakroliesterin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

Betulonihapo-28-karvakroliesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

## Betulonihippo-28-karvakroliesterin MS-spektri

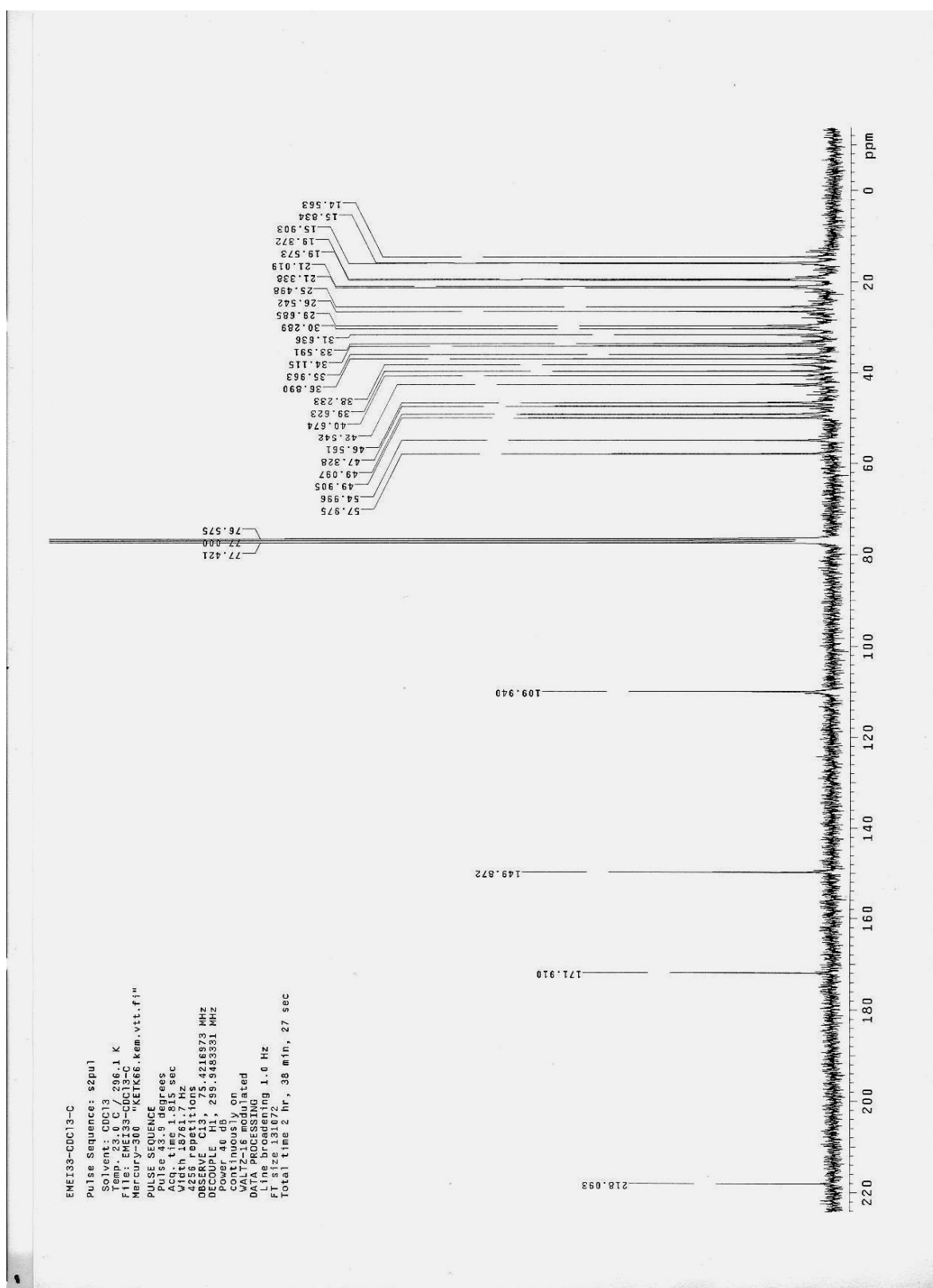


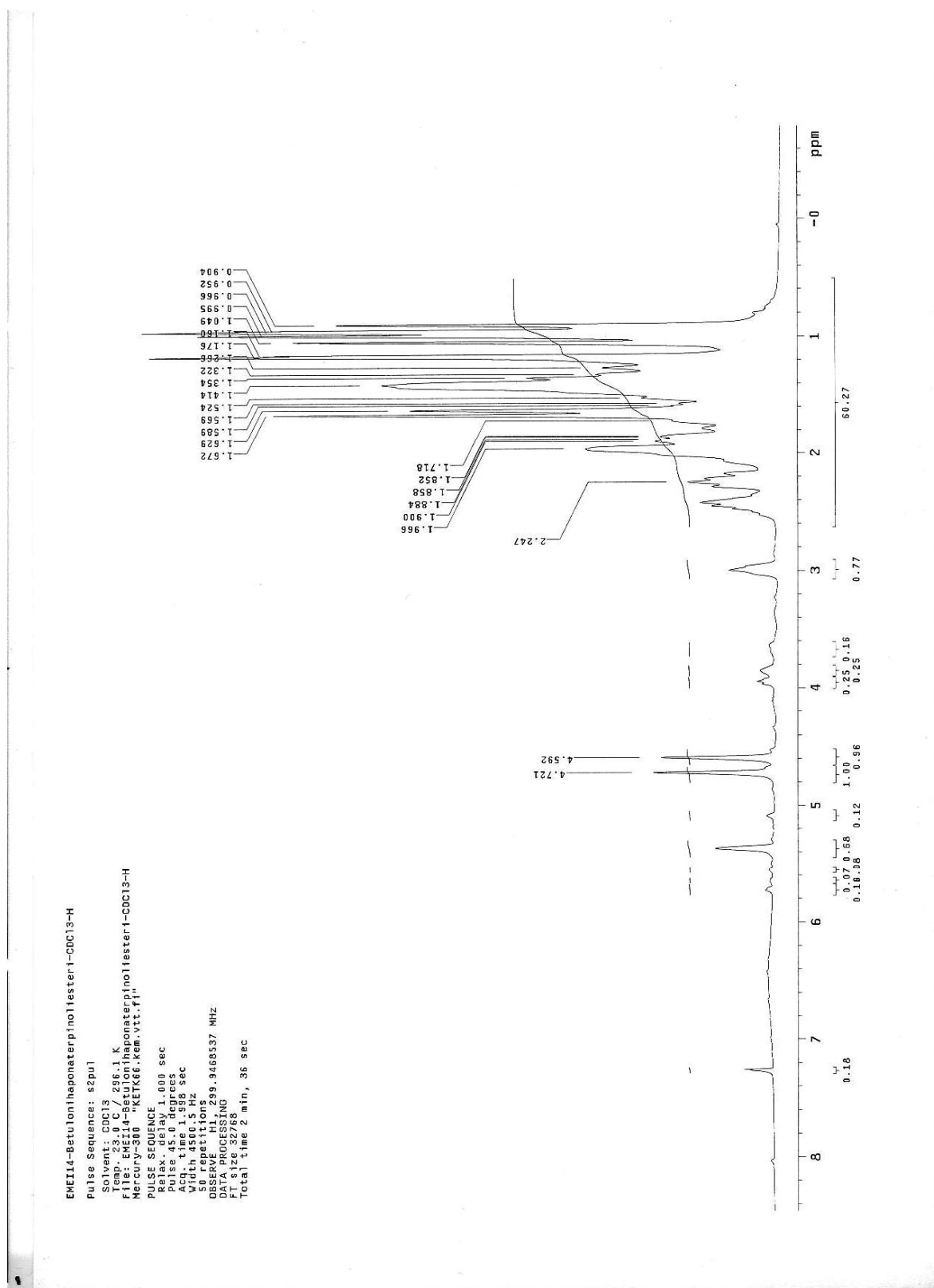
Betulonihippo-28-mentoliesterin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

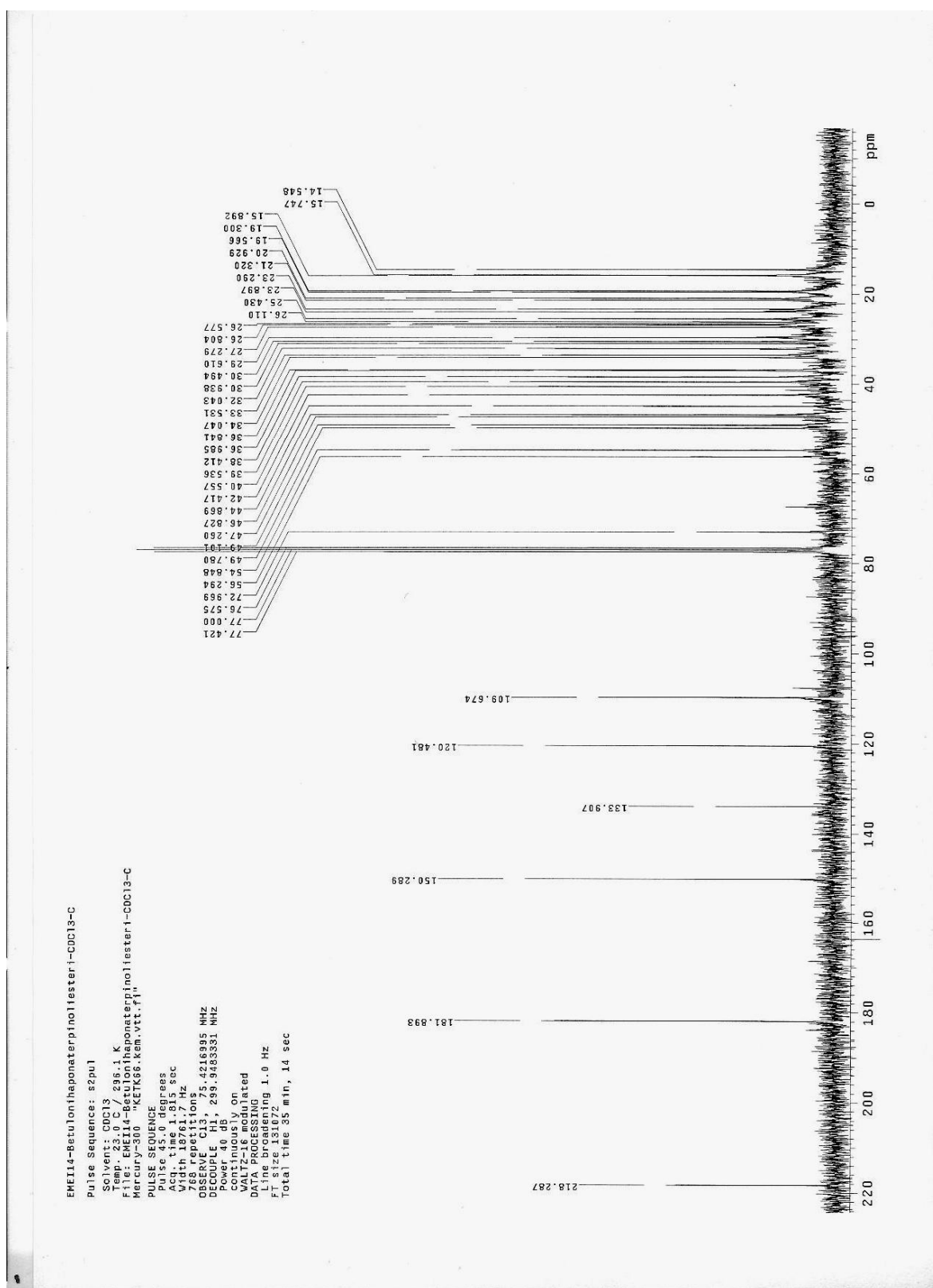
Betulonihippo-28-mentoliesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri





Betulonihippo-28-borneoliesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

Betulonihapo-28- $\alpha$ -terpinoliesterin  $^1\text{H}$ NMR-spektri

Betulonihippo-28- $\alpha$ -terpinoliesterin  $^{13}\text{C}$ NMR-spektri

## Kokoava synteesitaulukko

Tuote	M (g/mol)	n (mmol)	m (g)	Saanto-%	sulamispiste (°C)	puhtaus-%
betuliini-28-ferulihappoesteri	618,91	0,10	0,06	7,8	141	93
betulonihippo-28-vanilliiniesteri	588,84	0,63	0,37	20	134-135	93
betulonihippo-28-karvakroliesteri	586,91	0,41	0,24	13	128-129	93